

Université de Montréal

Contrôle des effets de surfaces pour minimiser la délocalisation du gras viscéral en Imagerie par
Spectrométrie de Masse

Par

Frédéric Fournelle

Département de chimie, Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Maître ès (M. Sc.) en chimie

Juin 2021

@ Frédéric Fournelle

Université de Montréal

Département de chimie, Arts et sciences

Ce mémoire intitulé

**Contrôle des effets de surfaces pour minimiser la délocalisation du gras viscéral en Imagerie
par Spectrométrie de Masse**

Présenté par

Frédéric Fournelle

A été évalué(e) par un jury composé des personnes suivantes

Prof. Pierre Thibault

Président-rapporteur

Prof. Pierre Chaurand

Directeur de recherche

Prof. Jean-François Masson

Membre du jury

Résumé

Les lipides représentent une classe essentielle de biomolécules au fonctionnement normal des organismes vivants. Étant donné leur complexité et leur très grande diversité, les analyses du lipidome combinent généralement une méthode de séparation analytique et une détection par spectrométrie de masse. Bien que ces méthodes d'analyses présentent plusieurs avantages, elles requièrent généralement une homogénéisation de l'échantillon préalablement à l'analyse. La conséquence est la perte de l'information spatiale des analytes au travers de l'échantillon.

L'imagerie par spectrométrie de masse (IMS) est une technologie de pointe permettant de cartographier au niveau moléculaire des sections tissulaires minces sans homogénéisation préalable de l'échantillon. Cette technique d'analyse permet de caractériser une vaste gamme d'analyte d'intérêt sans l'utilisation de marqueurs spécifiques. Ainsi, cette cartographie moléculaire peut être combinée à des méthodes de coloration tissulaires ou de microscopie optique afin de corrélérer précisément les résultats obtenus avec les histologies des sections. En revanche, la délocalisation potentielle des analytes d'intérêt au travers de la section entraîne de graves erreurs d'interprétation et prévient la corrélation exacte des résultats IMS avec les régions histologiques d'intérêt.

Les travaux mis en évidence dans ce mémoire présentent le développement, la caractérisation et l'utilisation d'une nouvelle lame d'analyse pour l'IMS permettant de drastiquement réduire la délocalisation des triacylglycérols (TAG) présents dans le gras viscéral. Dans un premier temps, ces travaux montrent la délocalisation des TAG sur et hors-section tissulaire ainsi que leur induction sur la migration conjointe de plusieurs classes de phospholipides (PL) dans leurs déplacements. Par la suite, l'amplitude de la délocalisation des TAG fut étudiée sur 12 types de lames différentes, et la caractérisation de la topographie et de l'hydrophobicité de ces lames à permis de mieux comprendre la relation entre la surface et l'ampleur de la délocalisation des TAG. Pour finir, le potentiel antidélocalisation d'une nouvelle lame en aluminium oxydé fut étudié avec deux tissus comprenant une large proportion de gras viscéral soit un échantillon de muscle de bœuf présentant des stries de gras internes et un rein de souris bordé de gras. Cette nouvelle lame permet une forte ségrégation des TAG comparativement aux résultats obtenus sur les lames

commerciales couramment utilisées et ainsi augmenter la fidélité des analyses IMS obtenues. Cette nouvelle méthode permettra entre autres l'analyse de plusieurs organes et tissus d'intérêt très gras autrement difficile à analyser tel que le rein, la médulla surrénale, certains muscles et cancer du sein.

Mots-clés : Imagerie par spectrométrie de masse, MALDI, Triacylglycérol, Lipides, Délocalisation, Surface.

Abstract

Lipids represent an essential class of biomolecules for the normal functioning of living organisms. Because of their high complexity and diversity, lipid analysis generally requires the combination of an analytical separation method with mass spectrometry detection. Although these methods present many advantages, they also generally require sample homogenization prior to analysis. This implies the loss of analyte spatial localization information within the sample.

Imaging mass spectrometry (IMS) is a frontier technology that allows to generate molecular cartography of thin tissue sections without prior homogenization of the sample. This technique allows to characterize a vast variety of analyte without the use of any specific markers. IMS molecular cartography can be combined to staining methods for optic microscopy to precisely correlate results with the underlying histological features. On the other hand, potential delocalization of analytes throughout the section would prevent correlation of the IMS results with any histological landmarks and lead to severe misinterpretation by an unaware analyst.

The work in this master's thesis presents the development, characterization and use of a new slide for IMS analyses allowing a drastic decrease the delocalization of triglycerides (TAG) abundant in visceral fat. In the first part of this work, TAG delocalization on and off tissue section and its effect on phospholipids (PL) delocalization was characterized. Subsequently, the extend of TAG delocalization was evaluated on 12 different slides and both surface topography and hydrophobicity studies allowed to better understand the relationship between surface chemistry and TAG delocalization. Finally, the ability of an optimal aluminum oxide slide to decrease visceral fat delocalization was investigated using fat-marbled beef sections and kidneys surrounded by significant fat bundles. This new aluminum oxide slide presents a strong segregation for TAG in comparison to commercially available ITO-coated slides.

Overall, this new aluminum oxide slide can considerably limit TAG delocalization and improve IMS fidelity and will enable the analyses of multiples organs and samples presenting large amounts of fat such as kidney, adrenal medulla, muscles, and breast cancer, otherwise very difficult to analyze using traditional slides.

Keywords: Imaging mass spectrometry (IMS), MALDI, Triacylglycerols, Lipids, Delocalization, Surface

Table des matières

RÉSUMÉ	III
ABSTRACT	V
TABLE DES MATIÈRES	VII
LISTE DES TABLEAUX	IX
LISTE DES FIGURES	XI
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XIII
REMERCIEMENTS	XVII
CHAPITRE 1 – L’IMAGERIE PAS SPECTROMÉTRIE DE MASSE PAR MALDI.....	1
1.1. HISTORIQUE.....	1
1.1.1. <i>L’ionisation par désorption laser (LDI)</i>	1
1.1.2. <i>La désorption-ionisation assistée par matrice (MALDI)</i>	1
1.2. THÉORIE DU MALDI	2
1.2.1. <i>Mécanismes d’ionisation des ions en MALDI</i>	2
1.2.2. <i>Mécanismes d’ionisation primaire</i>	3
1.2.3. <i>Mécanismes d’ionisation secondaires</i>	5
1.2.4. <i>Type de réactions secondaires</i>	5
1.2.5. <i>Suppression ionique dans la plume de désorption</i>	7
1.3. AVANTAGE ET INCONVÉNIENT DE LA DÉSORPTION-IONISATION LASER ASSISTÉE PAR MATRICE.....	8
1.4. <i>L’analyseur par temps de vol (TOF)</i>	8
1.4.1. <i>Théorie</i>	9
1.4.2. <i>L’extraction retardée</i>	11
1.4.3. <i>Le réflectron</i>	13
1.5. LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE EN TANDEM TOF/TOF (MS/MS).....	14
1.6. L’IMAGERIE PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE (IMS) MALDI	16
1.6.1. <i>Introduction à la cartographie moléculaire</i>	16
1.6.2. <i>IMS de sections tissulaires minces</i>	19
1.7. LA DÉSORPTION-IONISATION LASER ASSISTÉE PAR SURFACE (SALDI)	23
1.7.1. <i>Historique de l’analyse par SALDI</i>	24
1.7.2. <i>Intérêt envers l’approche SALDI</i>	24
1.8. LE REIN	25
1.9. OBJECTIFS DE RECHERCHE	26

CHAPITRE 2 – MINIMIZING VISCERAL FAT DELOCALIZATION ON TISSUE SECTION WITH POROUS ALUMINUM

OXIDE SLIDES FOR IMAGING MASS SPECTROMETRY	29
2.1. ABSTRACT	30
2.2. INTRODUCTION	30
2.3. MATERIALS AND METHOD	32
CHEMICALS AND REAGENTS	32
TISSUE SAMPLING AND SECTIONING	33
ALUMINUM OXIDE SLIDE ANODIZATION	33
SURFACE CHARACTERIZATION	34
METAL SPUTTER DEPOSITION	35
SYSTEMATIC ANALYSIS OF DELOCALIZATION	35
CARBONATE BUFFER AND MATRIX SPRAY DEPOSITION	35
MATRIX SUBLIMATION	36
MS AND IMS DATA ACQUISITION AND ANALYSIS	36
2.4. RESULTS & DISCUSSION	36
ION SUPPRESSION EFFECTS ON PHOSPHOLIPIDS INDUCED BY VISCERAL FAT DELOCALIZATION	36
MALDI IMS SUBSTRATE SELECTION	38
ALUMINUM OXIDE SLIDE SURFACE CHARACTERIZATION	40
EVALUATION OF TRIGLYCERIDE DELOCALIZATION BY CBS-AuLDI IMS	42
EFFECTS OF 1,5-DAN SUBLIMATION ON FAT DELOCALIZATION	44
CONSIDERATIONS AND RECOMMENDATIONS FOR IMS OF FATTY TISSUES	47
2.5. CONCLUSIONS	47
2.6. ACKNOWLEDGEMENTS	48
2.7. SUPPLEMENTAL INFORMATION	49
CHAPITRE 3 – CONCLUSION	59
3.1. PERSPECTIVES	60
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	63

Liste des tableaux

Supplemental table 1 : Protocol for H&E staining.....	56
Supplemental table 2 : Assignments of observed PL ions by MALDI MS/MS.....	57

Liste des figures

Figure 1.1 : Schématisation du processus d'ionisation MALDI	3
Figure 1.2 : Représentation schématique du phénomène de photo excitation/puits d'énergie menant à l'ionisation des molécules de matrices.	4
Figure 1.3 Schématisation simplifiée d'un analyseur par temps de vol.....	9
Figure 1.4 : Schéma représentant un analyseur de masse à temps de vol (TOF) suivant la désorption laser	12
Figure 1.5 : Schématisation d'un analyseur TOF comprenant une source à extraction retardée et un miroir électrostatique (réflectron).	14
Figure 1.6 : Schématisation d'un analyseur en mode TOF/TOF et d'une analyse MSMS avec TIS.....	16
Figure 1.7: Schéma représentant les différentes étapes d'une analyse typique IMS par MALDI TOF.....	18
Figure 1.8 : Schématisation des trois méthodes de déposition de matrices utilisées dans les travaux présentés dans ce mémoire.	19
Figure 1.9 : Structure des familles de lipides principalement étudiées dans les travaux présentés dans ce mémoire.	21
Figure 1.10 : Coloration à l'hématoxyline et à l'éosine d'une section de rein de 12 μm d'épaisseur.	26
Figure 2.1 : Molecular characterization of fat delocalization by IMS using fat-free kidney homogenate sections with and without fat doping with a lateral resolution of 100 μm	38
Figure 2.2 : On-tissue fat delocalization observed after silver sputtering for all the 13 slides tested.	40
Figure 2.3 : CBS-AuLDI IMS analysis of serial sections from a highly fatty mouse kidney after thaw-mounting on aluminum porous type (POR-30 min) and ITO-coated slides.	43
Figure 2.4 : CBS-AuLDI IMS analysis of serial marble beef sections thaw-mounted on porous type aluminum oxide (POR-30 min, top row) and ITO-coated (bottom row) slides acquired with 100 μm of spatial resolution.	44

Figure 2.5 : Phospholipid MALDI IMS of serial highly fatty mouse kidney sections mounted on porous aluminum oxide (POR-30 min) and ITO-coated glass slides.....46

Liste des sigles et abréviations

Note. Afin de simplifier la consultation de la littérature citée, les abréviations en anglais sont utilisées dans ce mémoire. Les descriptions en français sont écrites et les traductions sont inscrites en italique.

1,5-DAN	1,5-diaminonaphtalène
2,6-DHA	2,6-dihydroxyacetophénone
9AA	9-aminoacridine
Au	Or
AuLDI	Désorption/ionisation laser assisté par l'or
BAR	Oxide de type barrière
CBS	Solution de tampon carbonate
CID	Dissociation induite par collision
DHB	Acide 2.5-dihydroxybenzoïque
ETD	Dissociation induite par transfert d'électron
FA	Acide gras
FDZ	Zone de délocalisation du gras
FTICR	Résonance cyclotronique d'ions par transformée de Fourier
GC	Chromatographie gazeuse
IMS	Imagerie par spectrométrie de masse
ITO	Oxyde d'indium et d'étain
LC	Chromatographie liquide
LDI	Désorption/ionisation laser
MS	Spectrométrie de masse
Na₂CO₃	Carbonate de sodium
NaAC	Acétate de sodium
NaHCO₃	Bicarbonate de sodium

OCT	Polymère de température optimale de coupe
PA	Glycerophosphatidic
PC	Glycerophosphocholine
PE	Glycerophosphoéthylamine
PEG	Polyéthylène glycol
PG	Glycercrophosphoglycérol
PI	Glycerophosphoinositol
PIE	Extraction retardée
PL	Phospholipids
POR	Oxide de type poreux
PS	Glycerophosphosérine
PSD	Décomposition post-source
PVA	Alcool polyvinylique
SALDI	Désorption/ionisation laser assistée par surface
SEM	Microscopie électronique à balayage
SIMS	Spectrométrie de masse des ions secondaires
SM	Sphingomyélines
TAG	Triacylglycérol
TIS	Sélecteur de temps de vol
TLC	Chromatographie sur couche mince
TMA	Microréseaux de tissus
TOF	Temps de vol

« L'éducation est l'arme la plus puissante que l'on puisse utiliser pour changer le monde. »

Nelson Mandela

Remerciements

Dans un premier temps, je remercie le professeur Pierre Chaurand de m'avoir accepté dans son groupe de recherche et de m'avoir ouvert les portes du monde fantastique qu'est l'imagerie par spectrométrie de masse. J'ai beaucoup appris à vos côtés et je garderai toujours un profond attachement pour l'Imagerie MS. Merci de m'avoir permis de participer à deux grandes conférences aux États-Unis. Je garderai un souvenir particulier d'Asilomar.

J'aimerais remercier tous les membres présent et passé du groupe de recherche et en particulier Ethan Yang. Merci de m'avoir transmis tout ce que tu savais de ce merveilleux domaine. Merci de m'avoir aidé dans mes projets. Je me souviendrai de nos belles discussions dans le laboratoire ainsi que de nos innombrables réparations du MALDI. Je suis fier d'avoir travaillé avec toi ! Merci aussi à Martin d'avoir répondu à mes questions même si tu étais déjà loin. Merci à Nidia pour l'aide que tu m'as apporté dans les moments plus difficiles. Merci aux membres actuels du groupe pour les bons moments que nous avons passé ensemble. Zari, Luna et Rachel, je vous souhaite le plus grand des succès dans tous vos projets.

J'aimerais remercier tous les membres des ateliers mécanique et électronique. Chacun d'entre vous faites la différence dans le parcours de tous les étudiants du département. J'ai arrêté de compter le nombre de fois que je suis apparu par surprise dans l'atelier en espérant que vous sauviez la situation. Au fil du temps, j'ai compris que rien n'était impossible, mais je n'aurais jamais été en mesure de faire la moitié de ce que nous avons fait sans votre aide. Un merci particulier à Jean-François Myre, Jean-Sébastien Mayer et Martin Lambert pour toutes les pièces sur mesures que vous avez usiné pour moi. Il y a un peu de vous dans chacune des lames en aluminium et je vous en remercie. Un grand merci à Michel Brunette et Louis Beaumont pour toute l'aide que vous m'avez apporté lors de chacune des réparations que nous avons fait dans le laboratoire.

Je veux aussi remercier le professeur Jean-François Masson pour son support au long de mes études graduées. Merci de m'avoir accordé ma première expérience en recherche, mais surtout pour avoir mis sur pied l'équipe canadienne participant à la compétition SensUs. J'ai eu le privilège de participer pendant deux années à ce long processus et ce fut l'une des expériences

les plus enrichissante de ma vie. Merci aussi à tous les membres avec qui j'ai partagé cette expérience, mais particulièrement à Jean-Antoine Gauthier-Cyr, Myriam Cliche, Elizabeth Elder, Javier Guerrero et Antoine Daigneault-Demers pour la folle aventure que fut l'édition 2019. Cette expérience hors de l'ordinaire m'a fait comprendre l'ampleur des possibilités lorsqu'une équipe déterminée met tout son cœur dans un projet. Je ne l'oublierai pas.

Je veux aussi remercier tous ceux et celles avec qui j'ai discuté pendant ces longues années. Ces discussions ont forgé mon sens éthique ainsi que ma compréhension du monde.

J'aimerais remercier mes parents, Lucie et Martin, qui m'ont toujours encouragé et soutenu dans la poursuite de mes études. Vous avez toujours su comment encourager le développement de ma grande curiosité. L'éducation est le plus grand cadeau que l'on puisse offrir à un enfant et je vous en remercie. Je veux aussi remercier ma sœur Catherine pour son support et les belles discussions dans les moments plus difficiles. Je n'ai pas de mots assez forts pour remercier ma conjointe, Chloé, qui a su m'épauler et m'écouter depuis le début de mes études graduées. Je n'y serais jamais arrivé sans ta présence à mes côtés.

Chapitre 1 – L'imagerie par spectrométrie de masse par MALDI

1.1. Historique

Suivant les travaux de Wilhelm Wien, le premier instrument permettant de séparer les ions par leur rapport de masse sur charge fut construit par Joseph John Thomson¹, aussi appelé le père de la spectrométrie de masse. Ce premier instrument employait une séquence de champs électrique et magnétique parallèle permettant de faire dévier verticalement les ions selon leurs vitesses initiales grâce au champ électrique et horizontalement selon leur rapport masse/charge (m/z) grâce au champ magnétique. Les ions ainsi séparés entrent en contact avec une plaque fluorescente et un patron luminescent indique la position des impacts correspondant aux m/z des ions. Bien que simpliste, cet appareil permit la découverte du concept d'isotope suivant la découverte du Néon 20 et 22². Cette découverte extraordinaire ouvrit la porte du monde de la spectrométrie de masse vers de nouveaux analyseurs de masse et de nouvelles sources d'ionisations des molécules³⁻⁸.

1.1.1. L'ionisation par désorption laser (LDI)

Vers la fin des années 1960, l'ionisation par désorption laser (LDI) fut introduite par plusieurs chercheurs^{9,10} et permettait l'analyse de sels inorganiques de faibles poids moléculaires ainsi que de petites molécules organiques absorbant la lumière. Cependant, la LDI permettait difficilement d'obtenir des spectres de masse de grande qualité pour les molécules organiques, et de grands efforts furent nécessaires afin de favoriser l'adoption de la LDI par un plus grand nombre d'utilisateurs. La découverte de la désorption - ionisation laser assistée par matrice (matrix-assisted laser desorption ionization, MALDI)^{11, 12} et la combinaison de cette source d'ionisation à un analyseur par temps de vol (time of flight, TOF) permit à la LDI de prendre un second souffle de développement.

1.1.2. La désorption-ionisation assistée par matrice (MALDI)

En MALDI, l'échantillon est normalement mélangé dans une solution de solvant contenant un très grand excès de matrice et ensuite, un volume de l'ordre du microlitre est pipeté sur une plaque

d'échantillon. Une co-cristallisation entre la matrice et la molécule échantillon se produit à la suite de l'évaporation des solvants. L'irradiation de ces cristaux par une impulsion laser brève induit la désorption – ionisation ; la matrice absorbe l'énergie du laser qui est alors localement sublimée ce qui permet la désorption des composés et l'ionisation des analytes d'intérêts. En spectrométrie de masse par temps de vol, les ions sont ensuite transférés dans l'analyseur de masse grâce à l'application d'un potentiel dans la source d'ionisation. La matrice utilisée est normalement une molécule organique de faible poids moléculaire possédant cinq caractéristiques communes^{13, 14}

- 1) Posséder au minimum un groupement chromophore permettant l'absorption à la longueur d'onde du laser;
- 2) Favoriser la formation d'ions chargés et donc généralement posséder un groupement acide ou basique permettant d'aider respectivement à la formation d'ions positivement ou négativement chargés par transfert de protons;
- 3) Être très soluble dans les solvants organiques compatibles avec les analytes d'intérêts;
- 4) Permettre la co-cristallisation avec l'analyte. Lors de l'ionisation, cela limite la formation d'amalgame d'ions (clusters), ce qui diminue la complexité des spectres de masse. De plus, la formation de microcristaux homogènes permet des analyses beaucoup plus reproductibles et limite la présence de points chauds (*hot spots*)^{14, 15};
- 5) Posséder une faible tension de vapeur afin d'être stable sous les grands vides utilisés en dans les sources MALDI, typiquement de l'ordre de 10^6 - 10^7 mbar pour les systèmes TOF.

1.2. Théorie du MALDI

1.2.1. Mécanismes d'ionisation des ions en MALDI

Le développement du MALDI s'est fait de façon très empirique. Plusieurs auteurs s'entendent pour dire que les processus fondamentaux ayant lieu en MALDI sont encore mal compris et que plusieurs études fondamentales sont encore nécessaires¹⁶. Ces études permettraient de mieux comprendre les phénomènes ayant lieu et d'en prédire les résultats, ce qui faciliterait le développement futur de la technologie. La figure 1.1 montre une schématisation du processus d'ionisation des ions en MALDI.

Les mécanismes d'ionisation des analytes sont nombreux et aucun mécanisme ne semble s'appliquer à toutes les situations. Il est généralement accepté que l'ionisation peut se séparer en deux moments distincts, soit des mécanismes d'ionisation primaires et secondaire¹⁶; les

mécanismes d'ionisation primaire ayant lieu dans la phase solide ou directement suite à l'impulsion laser tandis que les mécanismes d'ionisations secondaires ont lieu pendant la désorption ou la phase d'expansion supersonique. Deux modèles se distinguent des autres dans la phase d'ionisation primaire. Ces modèles sont le modèle d'agrégats¹⁷ (cluster model) ainsi que le modèle de photoexcitation/puits d'énergie (photoexcitation/pooling)¹⁸.

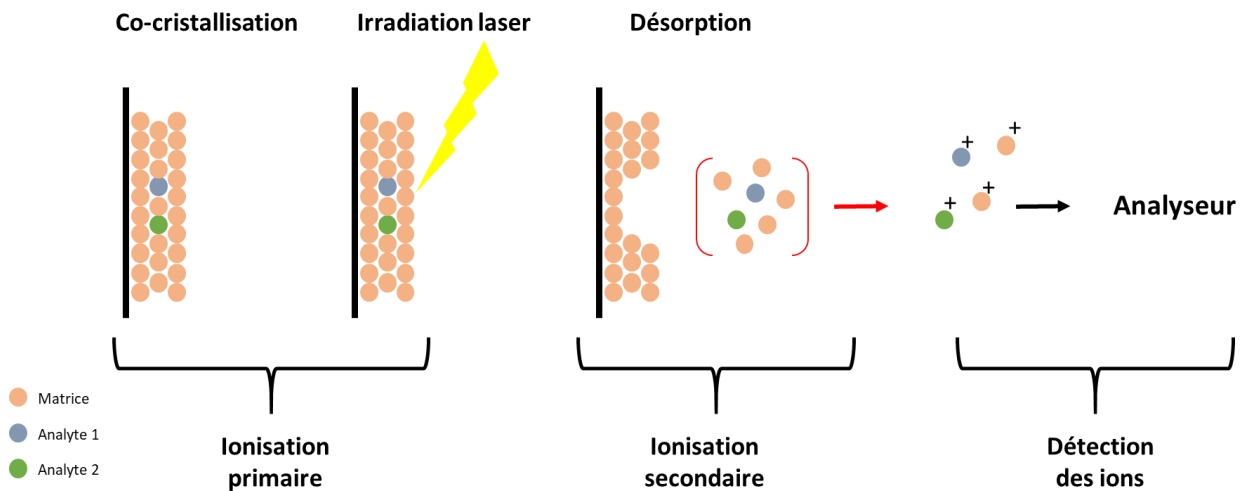


Figure 1.1 : Schématisation du processus d'ionisation MALDI

1.2.2. Mécanismes d'ionisation primaire

Le modèle d'agrégat propose que les ions soient largement préformés lors de la phase de cristallisation et que, selon le modèle du survivant unique (lucky survivor), les ions se neutralisent en phase de désorption suivant des mécanismes secondaires. Ce mécanisme permet d'expliquer pourquoi la majorité des ions formés et analysés par MALDI sont simplement chargés. En effet, les vitesses de neutralisation étant plus élevée pour les ions multiples chargés, ils se recombinent plus rapidement, ce qui laisse prédominer les formes simplement chargées. La séparation de charge pourrait avoir lieu mécaniquement pendant la désorption et générer des agrégats de plusieurs molécules possédant une ou plusieurs charges positives ou négatives. Ces agrégats perdraient ensuite leurs molécules neutres par évaporation ou éjection et les ions seraient produits à la suite des interactions coulombiennes.

Le modèle de photoexcitation/puits d'énergie permet de compléter ces explications. Il tient compte de la faible probabilité de photoexcitation directe de la matrice ou des analytes par irradiation du laser. Il est peu probable que cela survienne puisque l'énergie d'ionisation typique des matrices utilisées en MALDI est autour de 8 eV, ce qui nécessite 3 photons à longueur d'onde du laser UV (355 nm) utilisé pendant ces travaux. Considérant la faible puissance d'irradiation du laser de l'ordre du nanoseconde¹⁹, cette situation est peu envisageable. Cependant, des études proposent que l'énergie d'excitation électronique de deux molécules rapprochées pourraient se redistribués et ainsi atteindre des niveaux d'énergie supérieurs à la suite de la recombinaison. Ce phénomène est schématisé par la figure 1.2. Ce phénomène implique la redistribution de l'énergie entre deux molécules excitées et résulte d'interactions fortes entre les orbitales π des molécules impliquées^{20,21}. Dans le cas où la recombinaison est efficace, cela pourrait mener à des états d'énergie suffisamment élevé afin d'ioniser les matrices ou les analytes et ainsi formé les premiers ions.

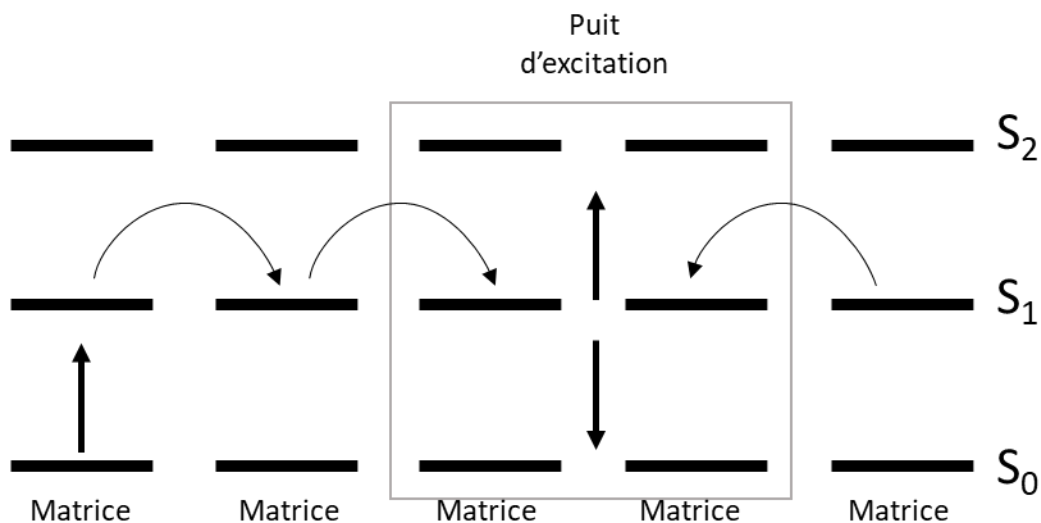


Figure 1.2 : Représentation schématique du phénomène de photo excitation/puits d'énergie menant à l'ionisation des molécules de matrices. La figure est adaptée de D. Setz et Knochenmuss²⁴.

1.2.3. Mécanismes d'ionisation secondaires

À la suite de la formation des premiers ions et de leur désorption, les réactions intra et intermoléculaires en phase gazeuse ne doivent pas être négligées. Ces réactions permettent d'expliquer plusieurs phénomènes courant et important ayant lieu dans les expériences MALDI tels que les effets de suppression ionique matrice-analytes, analyte-analyte ainsi que la formation d'ions simplement chargés.

Dans un premier temps, on doit considérer l'état d'expansion suite à la désorption comme un état de quasi-équilibre réactionnel régit principalement par la thermodynamique plutôt que la cinétique²¹. Ce faisant, l'abondance relative des ions dans un spectre de masse MALDI peut être déterminée par rapport à K dans l'équation 1 et permet d'aborder les réactions selon la thermodynamique. L'affinité électronique des analytes et de la matrice et la stabilité des complexes formés permet de prédire quel ion sera formé préférentiellement à la suite de l'état de quasi-équilibre.

$$\Delta G = -RT \ln(K) \quad (1)$$

Cette équation permet d'aborder le système de semi-équilibre selon l'idée que si l'énergie laser est basse, très peu d'ions et d'agrégat sont formés et expulsés en phase gazeuse, ce qui limite la probabilité d'observer les réactions secondaires en diminuant les collisions entre molécules. Ceci fut d'ailleurs étudié par Breuker et al. qui et montre qu'à de faibles énergies laser, les ions observés sont caractéristiques des mécanismes primaires tandis que les ions observés à de plus fortes puissances laser sont caractéristiques d'ions formés par des mécanismes secondaires suite aux collisions intermoléculaires²².

1.2.4. Type de réactions secondaires

Quatre différents types de réactions peuvent être présents dans la plume de désorption en phase gazeuse qui ont été très bien résumé par Knochenmuss et Zenobi²³. Dans un premier temps, le transfert de proton entre la matrice et les analytes est la réaction secondaire la plus fréquente et

importante et la grande majorité des analytes sont détectés sous forme d'adduit de protons selon la réaction générale suivante.



Cela est expliqué par leur plus grande affinité protonique, généralement supérieur à 900 kJ/mol pour les peptides et les protéines²⁴, tandis que les matrices ont généralement des affinités protoniques autour de 850 kJ/mol²⁵. Ces transferts de protons de la matrice vers les analytes sont donc thermodynamique favorable ($\Delta G = AP_M - AP_A$), mais peuvent aussi avoir lieu entre différentes espèces d'analytes présentant des différences d'affinité protonique

Dans un deuxième temps, l'ionisation pourrait avoir lieu par transfert de cations qui sont généralement Na^+ et K^+ en MALDI dans des conditions d'analyses de sections tissulaires biologiques. Cependant, ces adduits sont généralement beaucoup moins présents dans les spectres de masse et cela peut s'expliquer en partie par la plus faible abondance intrinsèque de ces ions, mais surtout par l'affinité cationique beaucoup plus faible que l'affinité protonique. L'affinité de Na^+ et K^+ envers les matrices couramment utilisées sont d'environ 160 kJ/mol et d'environ 50 kJ/mol et nous sommes dans le même ordre de grandeur que les analytes^{23, 26}. Les réactions sont donc moins favorisées, moins fréquentes, mais toutefois surtout présentent avec des matrices ayant de faibles affinités protonique²³.

Les deux dernières réactions pouvant mener à l'ionisation secondaire des ions sont le transfert d'électron et la capture d'électron. Les transferts d'électron sont favorisés lorsque le potentiel d'ionisation de la matrice est supérieur à celui de l'analyte ($\Delta H = PI(A) - PI(M)$)



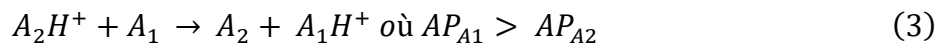
Cette situation est très rare considérant que les potentiels d'ionisation des matrices sont généralement environ du même ordre de grandeur que celle des analytes. Quant à elles, les réactions de transfert d'électron ne sont pas favorisées directement dans des conditions de MALDI normales et sont considérées comme étant des artéfacts reliés à l'irradiation laser des

plaques métalliques sur lesquelles sont préparés les échantillons. Considérant l'épaisseur des échantillons et de la matrice généralement utilisée, cela n'est normalement pas le cas²³.

1.2.5. Suppression ionique dans la plume de désorption

Par ailleurs, les réactions de formations secondaires des ions sont expliquées par l'effet de suppression ionique matrice-analyte et analyte-analyte. En effet, dans le cas commun où l'affinité protonique d'un analyte A_1 (AP_{A_1}) est supérieure à l'affinité protonique de la matrice M_1 (AP_{M_1}) et à la suite de l'ionisation primaire, plus de molécules M_1 sont protonées comparativement aux molécules A_1 .

À la suite de l'état de quasi-équilibre en phase d'expansion, M_1 transférera son proton à A_1 . Cette réaction est montrée par l'équation 2. Un spectre de masse dominé par A_1 est obtenu. Il a été montré que l'on peut varier l'abondance des signaux de matrice dans le spectre de masse en variant l'abondance de la matrice sur la plaque ou en augmentant l'énergie du laser^{23,27}. En effet, en augmentant le ratio M_1/A_1 , nous augmentons le ratio $[M_1 + H]^+/A_1$ et suite au transfert de proton, il reste des ions $[M_1 + H]^+$ en phase gazeuse qui sont ensuite détectés. Ceci est aussi vrai en augmentant la puissance du laser pour un même ratio M_1/A_1 puisque plus d'ions $[M_1 + H]^+$ sont ainsi formés. Ces réactions peuvent aussi survenir en remplaçant M_1 par une seconde analyte A_2 ($AP_{A_1} > AP_{A_2}$) également présent initialement dans la plume de désorption. A_1 sera ionisé préférentiellement comparativement à A_2 à la suite de l'échange de proton en phase gazeuse entre A_1 , M_1 et A_2 selon l'équation 3. Cette situation résultant en une plus grande intensité de A_1 versus A_2 dans le spectre de masse.



Ce phénomène est largement connu en MALDI et explique pourquoi plusieurs peptides sont absents de la cartographie peptidique en MALDI MS lorsqu'ils sont analysés dans un même mélange, mais facilement détectable lorsqu'ils sont analysés individuellement après séparation²³. Il est la source de plusieurs discussions et développement de méthode visant à ioniser préférentiellement certaines classes de molécules. Ces deux phénomènes (suppression ionique matrice-analyte et analyte-analyte) ne peuvent pas être directement expliqués par les

mécanismes d'ionisations primaires et démontrent que, lors d'une même analyse, plusieurs mécanismes d'ionisations autant primaire que secondaire peuvent avoir lieu simultanément.

1.3. Avantage et inconvénient de la désorption-ionisation laser assistée par matrice

L'ionisation par MALDI comporte plusieurs avantages. La matrice étant présente en large excès, elle protège l'intégrité des analytes d'intérêt en agissant comme tampon d'énergie. Ce faisant, les spectres de masse obtenus en MALDI présentent le plus souvent la forme intacte des analytes d'intérêts. Cela est particulièrement utile pour les protéines et les polymères plus difficile de détecter entièrement autrement. Aussi, tel que mentionné, l'analyse des spectres de masse obtenus par MALDI permet aussi de détecter majoritairement la forme simplement chargée des ions. La combinaison de ces deux caractéristiques permet l'analyse précise de mélanges complexes de molécules et biomolécules de très hauts poids moléculaires sous leur forme intacte.

Cependant, bien que très intéressante pour les analyses de molécules de très haut poids moléculaire, l'ionisation par MALDI favorise aussi l'ionisation des molécules de matrices. Ces molécules génèrent un fort effet de bruit de fond, spécialement intense en dessous de 600 Da. L'analyse de molécules de faible poids moléculaire comme les acides aminés et les sucres simples est de ce fait difficile et peut souvent se superposer aux signaux de matrices.

1.4. L'analyseur par temps de vol (TOF)

À la suite de la formation des ions, la détection de ceux-ci par un analyseur de masse est de mise. Depuis la détection des points d'impact sur plaque photographique par J.J Thomson, une multitude d'analyseurs de masse différents furent inventés. Tous possèdent des avantages et inconvénient, mais chacun permettant d'améliorer la sensibilité, la précision, la vitesse d'acquisition, la gamme dynamique des analyses comparativement à leurs prédécesseurs. L'un des plus vieux d'entre eux, l'analyseur par temps de vol (TOF), a connu un regain de popularité

suite à l'utilisation des méthodes d'ionisation pulsé vers la fin des années 1980²⁸. Deux nouvelles technologies permettent d'ailleurs d'augmenter drastiquement la résolution en masse des analyseurs à temps de vol soit l'utilisation d'une source à extraction retardée et d'un miroir électrostatique (réflectron).

1.4.1. Théorie

L'analyseur de masse TOF est un analyseur de masse pulsé, c'est-à-dire que de petits paquets d'ions sont analysés en même temps de façon discontinuée. Ce faisant, il s'adapte particulièrement bien aux sources d'ionisation pulsées telles que la LDI, MALDI et la spectrométrie de masse des ions secondaires (SIMS). Cependant, la combinaison de zones de stockage d'ions ou de systèmes orthogonaux permet de combiner ce type d'analyseur avec plusieurs autres types de sources d'ionisation.

Un TOF simplifié avec une source d'ionisation par MALDI est montré par la figure 1.3. Il comporte 2 régions principales : une région de formation et d'accélération des ions et une région de dérive des ions sans champs. À la fin de la zone de libre de champs se situe un détecteur. Les ions sont accélérés par un champ électrique pulsé constant (E) sur l'ensemble de la surface de la zone d'accélération. Les ions de même charge que le signe du champ électrique seront accélérés selon une énergie eV .

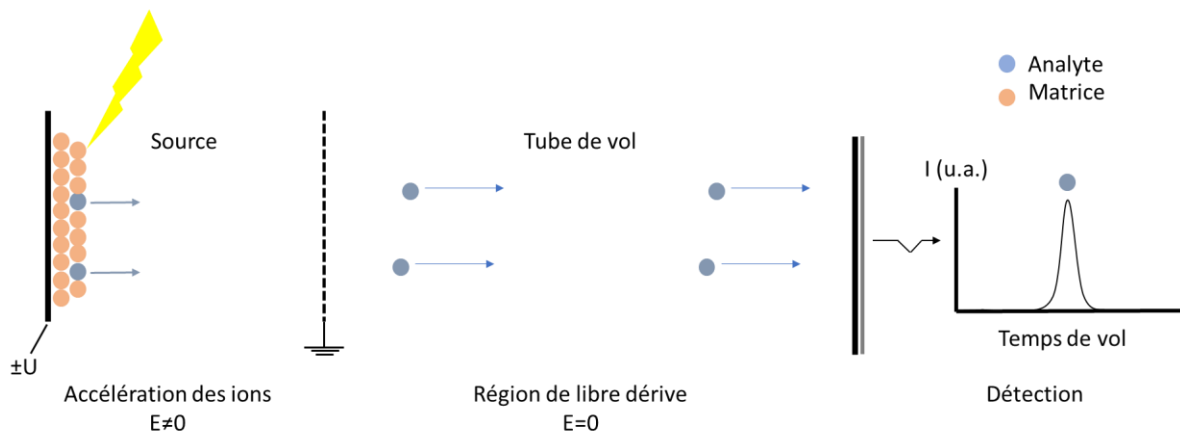


Figure 1.3 Schématisation simplifiée d'un analyseur par temps de vol

En entrant dans la zone libre de champ, les ions de mêmes charges possèdent la même énergie cinétique eV, mais une vitesse dépendant de leur masse. Selon un réarrangement de l'équation de l'énergie cinétique, on obtient l'équation 4 où t est le temps de vol et D est la distance de la zone libre de champ^{29, 30}.

$$t_{vol} = \left(\frac{m}{2eV} \right)^{1/2} D \quad (4)$$

Le temps de vol, t_{vol} est explicitement relié au rapport m/z qui nous intéresse en spectrométrie de masse et cette information peut être déterminée selon l'équation 5 en connaissant le potentiel appliqué dans la zone d'accélération ainsi que de la distance de la zone libre de champ.

$$t_{vol} = \frac{D}{\sqrt{2U}} \sqrt{\frac{m}{z}} \quad (5)$$

$$\frac{m}{z} = \frac{2Ut_{vol}^2}{D^2} \quad (6)$$

La résolution en masse peut donc être déterminé pour le pic désiré selon l'équation 7.

$$\frac{m}{\Delta m} = \frac{t}{2\Delta t} \quad (7)$$

Cependant, ces équations simples se basent sur plusieurs considérations approximatives. Premièrement, les ions de même m/z ne sont pas tous formés au même moment dans la zone d'accélération. Ce faisant, ils n'ont pas tous la même position dans la zone d'accélération ni le même temps d'accélération lors de l'application du potentiel. De plus, ils possèdent une distribution en énergie initiale due à la violence de la désorption laser et aux processus de formations des ions à la suite de la désorption. Cela provoque un grand élargissement des pics pour un m/z donné et diminue la précision en masse. Deux modifications instrumentales ont permis de pallier ces problèmes et drastiquement améliorer les performances analytiques des instruments à temps de vol soit l'extraction retardée et le miroir électrostatique (réflectron).

1.4.2. L'extraction retardée

Afin de compenser la différence de position des ions dans l'espace au moment de l'application du potentiel dans la zone d'accélération, il est nécessaire de modifier physiquement la source d'ionisation et d'y ajouter un second étage d'application de potentiel. Cette modification fut mise en place pour la première fois par Wiley et McLaren³¹ en 1955 et est de nos jours couramment disponibles dans les instruments commerciaux.

Une source d'extraction retardée, montrée à la figure 1.4C, fonctionne en appliquant une succession de potentiel (U_0 et U_1) entre les deux zones d'accélération. Considérons une situation où deux ions de mêmes m/z sont désorbés au même moment dans la première région de la source alors libre de champs. À ce moment, U_0 (typiquement ± 25 kV) est égal à U_1 . Il est primordial de laisser un délai, t_1 déterminé avant l'augmentation de E_0 afin de permettre l'expansion supersonique de la plume de désorption dans une zone sans champs. Cela permet d'augmenter la distance entre les molécules présentes dans la plume de désorption et limiter les collisions subséquentes entre les ions et les neutres lors de l'application d'un potentiel E_0 supérieur à E_1 ²⁸. Ces collisions entraîneraient une augmentation de la distribution de l'énergie interne des ions et de possibles fragmentation des ions suivant la production d'ions métastables²⁸. Ce délais de d'expansion en zone libre de champs est normalement de quelques centaines de nanosecondes²⁸. À la suite de la formation de l'expansion supersonique du nuage de matrice et d'analytes, un ion m_a se trouve plus près de la surface qu'un ions m_b . À la suite du délai t_0 , l'augmentation du potentiel E_0 génère un champ électrostatique dans le premier étage de la source et permet d'accélération plus grandement l'ion m_a , moins avancé dans la source, et ainsi lui conférer une plus grande énergie cinétique initiale à l'entrée de la zone E_1 comparativement à l'ion m_b , initialement plus loin dans la source E_0 . À la suite de l'entrée dans la zone E_1 , l'ion m_a possède une plus grande énergie cinétique que l'ion m_b , mais l'ion m_a a parcouru une distance x_0 plus grande que l'ion m_b . Il est donc en retard sur l'ion m_b .

L'application du potentiel E_1 permet d'accélérer également les ions. À la sortie de la zone E_1 , tous les ions ont une énergie égale provenant de E_1 , mais une énergie différente provenant de E_0 correspondant à leur position initiale dans la source E_0 . La différence d'énergie provenant de E_0 est compensée par la plus grande distance à parcourir initialement pour l'ion m_a . Pour une énergie

E_0 , les paramètres t_0 et E_1 sont ajustés afin que les ions m_a et m_b , de mêmes m/z , possède un même temps de vol. L'ajustement de ces paramètres permet de considérablement diminuer l'impact des différences de positions initiales et d'améliorer la résolution en masse des instruments en mode linéaire d'un facteur 3-4 et d'un facteur 2-3 en mode réflectron³².

Les ratios optimaux de t_0/E_1 doivent être déterminés pour chaque m/z et des compromis doivent être effectués lors d'une analyse sur une large gamme de m/z . Par ailleurs, des délais d'extraction, plus grands sont nécessaires pour effectuer des analyses d'ions de plus haut poids moléculaire²⁸.

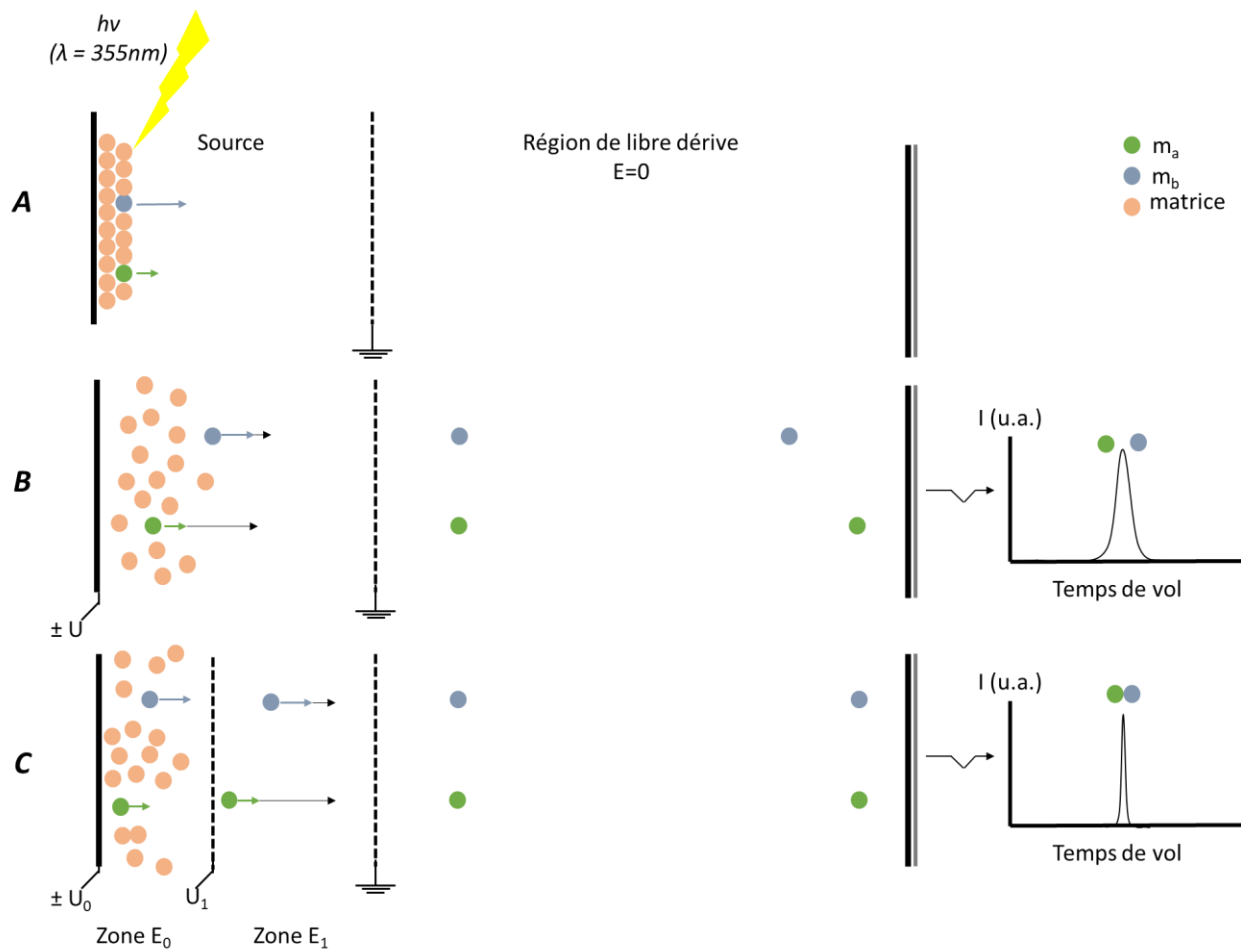


Figure 1.4 : Schéma représentant un analyseur de masse à temps de vol (TOF) suivant la désorption laser (A) avec une source d'extraction à champ constant (B) et avec une source d'extraction retardée (C).

1.4.3. Le réflectron

En 1957, Alikhanov³³ mit en place les bases permettant de compenser la dispersion d'énergie initiale présente entre les ions de même m/z à la sortie d'un miroir électrostatique. Mamyrin et al.³⁴ s'appuyèrent sur ces travaux et publièrent en 1973 un premier design permettant la MS-TOF à haute résolution. Un miroir électrostatique schématique est montré à la figure 1.5. Il est composé d'une série d'électrodes permettant de générer un champ électrostatique retardateur. Le potentiel appliqué sur l'électrode de fin du réflectron est généralement 1.05-1.10 fois la valeur du potentiel appliqué dans la zone d'extraction afin de maximiser la ré-accélération de tous les ions²⁸. Un second détecteur est placé après une seconde zone de dérive libre sans champ. Les ions pénètrent dans le réflectron selon une distance d_p , avant d'être réaccélééré dans le sens inverse et ressortent du réflectron possédant la même énergie cinétique qu'à leur entrée. Selon la situation où deux ions m_a et m_b de même m/z dérivent dans le tube de vol en même temps, mais possèdent une légère différence d'énergie cinétique où $k_{mb} > k_{ma}$, m_b pénétrera dans le réflectron plus profondément que m_a due à sa plus grande énergie cinétique. m_b , initialement en avance sur m_a , voit son t_{vol} augmenter comparativement à m_a due à son parcours plus grand à l'intérieur du réflectron. À la sortie du réflectron, m_b possède toujours une énergie cinétique supérieure à m_a , mais la différence d'énergie initiale, créant une différence de temps de vol, fut compensé par un temps plus long passé à l'intérieur du réflectron. La combinaison des potentiels appliqués sur le réflectron permet de varier $\Delta t_{vol(A-B)}$ et d'ajuster d_p à la distance fixe entre le réflectron et le second détecteur.

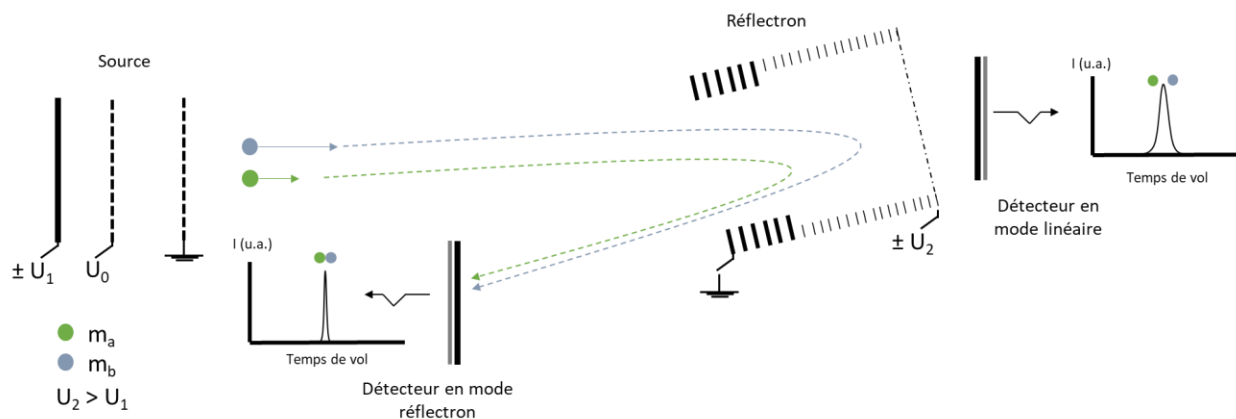


Figure 1.5 : Schématisation d'un analyseur TOF comprenant une source à extraction retardée et un miroir électrostatique (réflectron).

1.5. La spectrométrie de masse en tandem TOF/TOF (MS/MS)

Trois cas de fragmentation se doivent d'être définis lors d'une analyse MS par MALDI-TOF. Dans le cas où un ion se fragmenterait directement sous l'impact du laser (fragmentation en source), les multiples fragments de l'ion parent seraient accélérés et détectés individuellement tels des ions parents. Ce phénomène est difficile à détecter et n'affecte pas la qualité du spectre de masse. On peut cependant apercevoir ces fragments en variant la puissance du laser et en notant une diminution de l'intensité de l'ion parent proportionnelle à l'augmentation en intensité des ions fragments.

Dans un second cas, l'ion parent pourrait se fragmenter pendant son accélération dans la source d'ionisation. Ces ions sont dits métastables et provoquent un fort allongement avant (tailing) des signaux puisque les ions fragments possèdent une énergie cinétique intermédiaire entre celle de l'ion parent et celle d'un ion fragment accéléré depuis le début du processus. Ces ions sont généralement irrésolvables et contribuent au bruit de fond chimique. Ce type de fragmentation est évidemment non désiré.

En dernier, un ion parent pourrait se fragmenter après son accélération dans la zone de dérive libre de champs. Ce type de fragmentation métastable est appelé décomposition après source (PSD)³⁵. Selon la loi de conservation de quantité de mouvement, chaque ion fragment

conserverait une partie de l'énergie cinétique proportionnelle à sa masse et ils conservent donc une vitesse constante égale à celle de l'ion parent. Aucune différence ne serait donc observée en dans un système TOF linéaire³⁰. Cependant, ce type de fragmentation peut être exploité en mode réflectron³⁰.

Dans un système MALDI TOF/TOF, l'énergie du laser est ajustée à la hausse afin de favoriser la décomposition métastable de type PSD. Les ions parents sont accélérés et se fragmentent par décomposition métastable dans un premier tube de vol. A la fin du premier TOF est placé un sélecteur d'ions (timed ion selector - TIS). Ce TIS est une porte électrostatique préalablement calibrée qui permet sélectionner les ions d'intérêt avec une résolution d'environ 2-3 Da. L'ion parent sélectionné ainsi que ses ions fragments sont ensuite réaccélérés dans le second analyseur à temps de vol.

La figure 1.6 montre un schéma d'analyse MALDI TOF/TOF. Une première acquisition est faite qui permet d'identifier deux ions parents de différent m/z . P_a et P_b sont formés, accélérés et séparés dans le premier analyseur à temps de vol. L'ion précurseur P_a est ensuite sélectionné grâce au TIS. Une seconde acquisition est alors faite à plus haute énergie laser ionisant P_a et P_b et leur permettant d'acquérir suffisamment d'énergie interne pour se fragmenter en PSD dans le TOF₁. P_a produit des ions fragments F_1 à F_n atteignant la TIS selon le même temps de vol que l'ion parent P_a . À la suite de leur sélection par la TIS, les ions sont ensuite réaccélérés et sont séparés selon leur temps de vol dans le second analyseur à temps de vol.

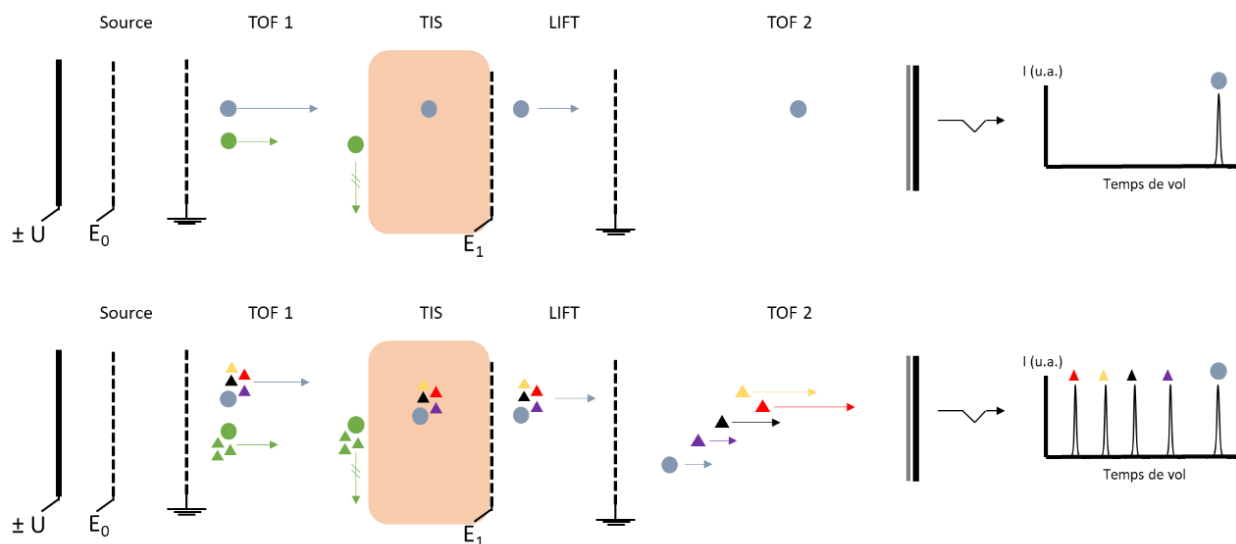


Figure 1.6 : Schématisation d'un analyseur en mode TOF/TOF et d'une analyse MSMS avec TIS.

La spectrométrie de masse en tandem est particulièrement importante lors d'expériences par MALDI-TOF. En effet, la plus faible résolution en masse des analyseurs TOF à géométrie co-axiale comparativement à celles offertes par un Orbitrap ou un FTICR, ne permet pas d'effectuer des analyses en masse précise. De plus, l'analyse MS/MS en mode TOF/TOF peut permettre l'identification de molécules isobariques, ce qui n'est pas possible en se fiant à l'analyse par masse précise. L'identification des composés doit donc être effectuée par MS/MS. Cependant, contrairement à l'analyse MS/MS sur d'autres systèmes, l'analyse en mode TOF/TOF permet de détecter avec une grande sensibilité l'ensemble des fragments générés lors de l'analyse.

1.6. L'imagerie par spectrométrie de masse (IMS) MALDI

1.6.1. Introduction à la cartographie moléculaire

L'imagerie par spectrométrie de masse (IMS) est une technologie puissante permettant de cartographier au niveau moléculaire des échantillons en deux dimensions sans l'utilisation de marqueurs spécifiques. L'IMS fut initialement inventé en utilisant la spectrométrie de masse

d'ions secondaires (SIMS)³⁶, mais fut adapté plus tard à l'ionisation par MALDI pour l'analyse de sections tissulaires minces par Caprioli et al³⁷. La figure 1.7 montre un schéma procédural d'analyse par MALDI IMS.

En MALDI IMS, l'échantillon est recouvert d'une fine couche de matrice préalablement à l'analyse et la figure 1.8 montre une schématisation des méthodes utilisées dans ces travaux. Les cristaux de matrice se doivent d'être le plus petit possible afin de permettre l'analyse à très haute résolution spatiale de l'ordre du micromètre. Cette couche de matrice se doit d'être la plus uniforme possible. Plusieurs technologies et méthodes d'application de matrice furent développées. L'application par nébulisation pneumatique (TM-Sprayer) permet une grande reproductibilité des dépôts et une meilleure extraction et co-cristallisation des analytes avec la matrice. Cependant, les solvants doivent être adaptés aux échantillons afin de limiter la délocalisation des analytes. La déposition de matrice par sublimation est une méthode de déposition sans solvant et permet d'obtenir des cristaux très petits. Cependant, le contrôle des paramètres peut être ardu et la reproductibilité d'une déposition à l'autre est moins grande que par nébulisation-pneumatique. Certains systèmes commerciaux sont disponibles, mais ne sont pas encore largement répandus. D'autres méthodes, tels que le dépôt par électronebulisation existe, mais n'ont pas été utilisées dans les travaux présentés dans ce mémoire.

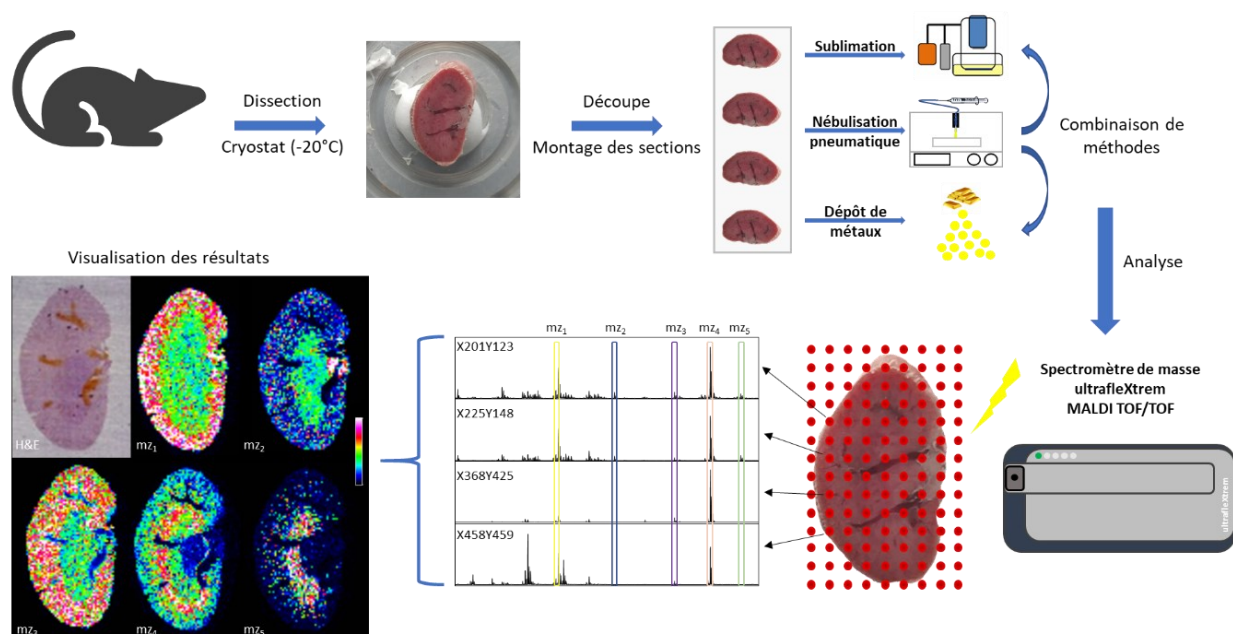


Figure 1.7: Schéma représentant les différentes étapes d'une analyse typique IMS par MALDI TOF.

Une partie ou la totalité de la surface de l'échantillon peut être analysé. Une grille d'acquisition est alors définie avec un intervalle de distance prédéterminé afin d'acquérir un spectre de masse à chaque position. Chaque spectre MS est défini selon sa position en x et y sur l'échantillon et caractérise un pixel d'information. La distance entre le centre de deux pixels représente la résolution spatiale. Les spectres de masse sont recombinaés par un logiciel et chaque m/z désiré peut être visualisé sous forme d'intensité relative par rapport au pixel le plus intense. Les images générées sont directement reliées à l'échantillon et on peut alors déterminer la distribution spatiale d'un ou de plusieurs analytes d'intérêts. En combinant les résultats IMS avec des techniques de microscopie optique ou de coloration tissulaires, il est possible de corréliser les distributions spatiales à des histologies particulières de l'échantillon. La puissance de l'IMS réside dans le nombre immense d'images caractéristiques différentes qu'il est possible de générer à la suite d'une seule analyse. Contrairement à l'analyse de sections par coloration histologique où par immunohistochimie où une seule image est produite, il est possible de générer par IMS autant

d'images que de signaux détectés au cours de l'acquisition. Ce nombre est généralement de plusieurs dizaines, voire des centaines, ce qui multiplie la quantité d'information disponible.

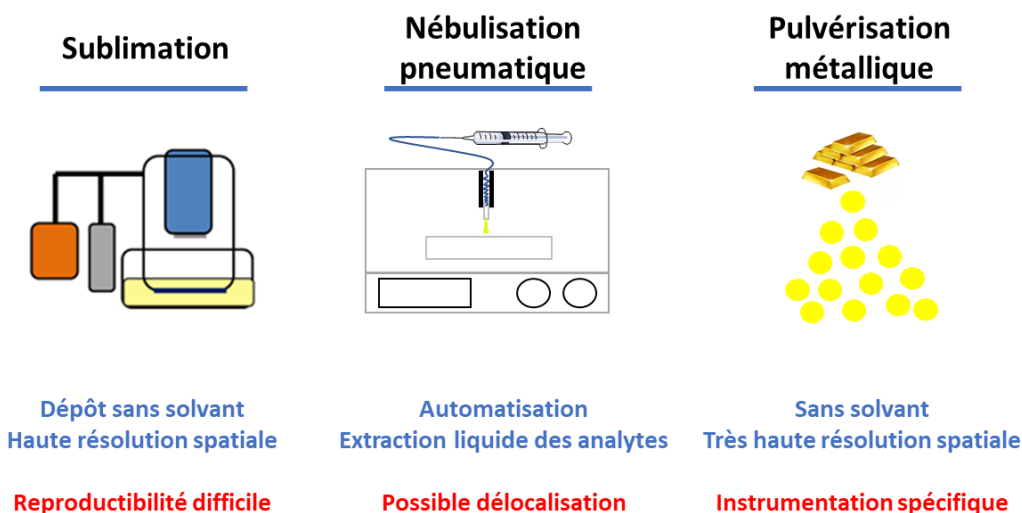


Figure 1.8 : Schématisation des trois méthodes de déposition de matrices utilisées dans les travaux présentés dans ce mémoire. Les caractéristiques en bleu et en rouge représentent respectivement les principaux avantages et inconvénients de chaque méthode

1.6.2. IMS de sections tissulaires minces

La préparation d'échantillon lors d'analyse de sections tissulaires minces est d'une importance capitale. En tout temps, des précautions particulières doivent être prises afin de conserver l'intégrité du tissu. Les tissus, organes ou organismes sont congelés sur glace sèche ou par plongeon dans l'azote liquide immédiatement après la dissection et conservés à -80°C jusqu'à la découpe. Cette étape est primordiale afin de diminuer au maximum l'activité enzymatique ou les phénomènes d'oxydation dégradant les tissus et aussi de limiter la migration des analytes dans les tissus afin d'obtenir des distributions spatiales représentant les distributions *in vivo*. À l'aide d'un cryostat maintenu entre -15 et -25°C , des sections tissulaires entre 10 et $20\ \mu\text{m}$ d'épaisseur sont ensuite découpées et montées sur les lames conductrices. Celles utilisées au laboratoire sont des lames de verre recouvertes d'une mince couche d'oxyde d'indium et d'étain (ITO). Les sections sont ensuite recouvertes de matrice et analysées directement par MALDI IMS. Les lames recouvertes de matrice peuvent aussi être congelé et analysées à un autre moment. Des analyses

ont montré la migration verticale préférentielle de lipides vers la couche de matrice après 24h à -20°C, améliorant la détection de ces espèces^{38, 39}.

Bien que les travaux présentés dans ce mémoire montrent seulement l'application de l'IMS à des échantillons tissulaires mammaliens, les analyses MALDI IMS ne s'y résument pas seulement. En effet, des analyses de sections tissulaires minces de plantes^{40, 41} et d'insectes⁴²⁻⁴⁴ sont courantes et apportent chacune leur lot d'informations sur les échantillons. Des analyses d'empreintes digitales déposées ou prélevées sur diverses surfaces^{45, 46} sont aussi couramment effectuées et permettent dans certains cas de déterminer l'âge des empreintes^{47, 48}.

1.6.2.1. IMS du lipidome

Les lipides représentent une des classes de biomolécules les plus importantes des systèmes vivants. L'ensemble du lipidome eucaryotique est estimé entre 10 000 et 100 000 molécules⁴⁹ et ses constituants sont impliqués dans une multitude de mécanismes. En effet, les lipides ont de nombreuses fonctions telles que la composition des membranes cellulaires⁵⁰, la signalisation⁵¹ et l'adhésion⁵² des cellules ainsi que le stockage d'énergie⁵³. Les grandes classes de lipides étudiées en MALDI IMS sont les glycérophospholipides (PLs), les lipides neutres, les cholestérols et les glycolipides. Les travaux présentés dans ce mémoire focaliseront principalement sur l'IMS des PLs et des TAGs montrés par la figure 1.9.

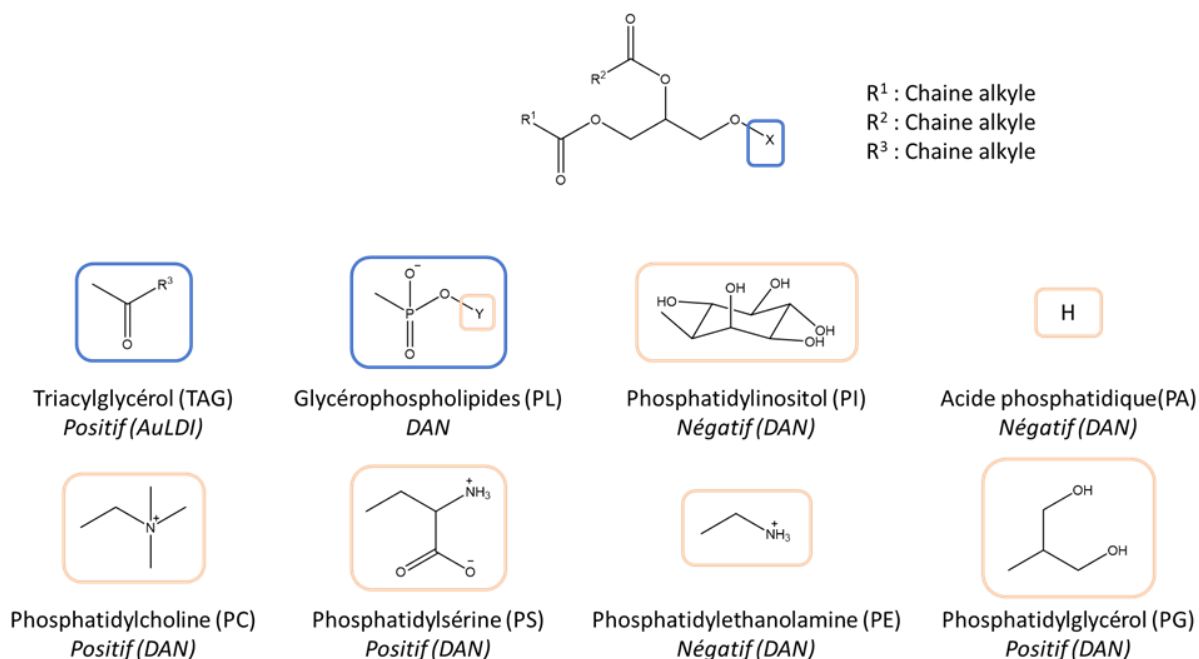


Figure 1.9 : Structure des familles de lipides principalement étudiées dans les travaux présentés dans ce mémoire.

L'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB)⁵⁴ est la matrice la plus utilisée pour l'analyse de lipides bien que le 1,5-diaminonaphtalène (DAN)⁵⁵, la 9-aminoacridine (9AA)⁵⁶, le 5-chloro-2-mercaptobenzothiazole (CMBT), la 2,5-dihydroxyacetophénone (DHA) soient aussi utilisés en mode d'ionisation positif et négatif^{55, 57}. Dans notre laboratoire, DAN et DHB sont les matrices les plus couramment employées pour l'analyse des lipides par IMS.

1.6.2.2. IMS des phospholipides avec DAN

Dans un premier temps, DAN est une matrice très intéressante puisqu'elle permet d'ioniser les lipides autant en mode positif qu'en mode négatif. Afin de procéder à l'analyse des PLs, DAN est normalement déposé par sublimation⁵⁵ entre 110 µg/cm² et 150 µg/cm². En mode positif, les spectres de masse sont dominés par les phosphocholines (PCs) dues à la charge positive nette sur la choline. Certains sphingomyélines (SMs)⁵⁵ et certains phosphatidylglycérols (PG) peuvent aussi être observés⁵⁷. Cependant, l'analyse en mode positif requiert une attention particulière puisque les adduits de sodiums et potassium sont souvent présents.

En mode négatif, les spectres de masse sont caractérisés par la présence majoritaire de phosphoéthanolamine (PE) due au proton acide présent sur la tête éthanolamine⁵⁸. Cependant, les spectres de masse en mode négatif avec DAN comme matrice sont beaucoup plus riches qu'en mode positif et on note très souvent la présence de glycérophosphoinositol (PI), phosphatidylsérine (PS), et d'acide phosphatidique (PA). De plus, contrairement aux analyses en mode positif, les spectres de masse en mode négatifs sont majoritairement composés de la forme déprotonée $[M-H]^-$. Par ailleurs, en augmentant la quantité de matrices autour de 250 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ et en effectuant certaines préparations d'échantillon, Yang et al ont montré la possibilité d'augmenter jusqu'à 10 fois l'intensité des signaux des gangliosides en mode négatif³⁸.

1.6.2.3. IMS des lipides neutres avec métaux

L'utilisation de métaux en tant que matrice inorganique permet d'augmenter la reproductibilité des analyses⁵⁹ et d'améliorer la sensibilité pour la détection de certaines classes de molécules^{60, 61}. En effet, les couches métalliques déposés par pulvérisation métallique^{62, 63} sont extrêmement homogènes en plus d'être extrêmement stable sous vide poussé ce qui permet des analyses IMS à très haute résolution spatiale^{59-61, 64}. Également, les matrices métalliques produisent très peu de signaux interférents comparativement aux matrices organiques traditionnelles⁵⁹. Cela les rend particulièrement intéressantes pour l'analyses de composés de faibles poids moléculaire comme les métabolites et les lipides neutres.

En 2013, Dufresne et al. ont démontré qu'un film d'argent de quelques nm déposé par pulvérisation métallique permettait de détecter de manière spécifique et sensible plusieurs lipides neutres très difficilement détectables autrement. En effet, ces travaux ont montré la désorption et l'ionisation de cholestérol intact ainsi que plusieurs acides gras sous forme d'adduit d'argent ($[M+Ag]^+$) suivant la déposition d'entre 16 et 23 nm d'Ag sur la surface de la section tissulaire. Les adduits sont formés avec les deux isotopes principaux de l'argent, Ag_{107} et Ag_{109} . Par ailleurs, les ions Ag sont aussi détectés sous forme d'agrégats sur la gamme de masse typiquement analysé qui est généralement de 100 à 1100 Da. Ces agrégats permettent d'effectuer un étalonnage interne en masse préalablement à l'analyse et aussi un réétalonnage

interne post-acquisition si nécessaire. Cette méthode fût d'ailleurs adaptée par Lauzon et al. pour l'analyse de composés endogènes et exogènes présent dans les traces digitales^{46, 64}. Suivant ces travaux, Dufresne et al. ont démontré qu'un film d'or de quelques nm déposé par pulvérisation métallique sur les sections tissulaires permettait une grande sensibilité et sélectivité pour la détection des triacylglycérols. Ils ont démontré que la déposition par nébulisation pneumatique de sel de sodium préalablement au dépôt de 28 ± 3 nm d'or permettait une augmentation de la sensibilité envers les TAGs d'un facteur 30 comparativement à la matrice couramment utilisée, le DHB. Cette grande augmentation est associée à une ionisation préférentielle des TAGs sous forme d'adduit de sodium ainsi qu'à une absorbance dans l'UV par la couche d'or déposée sur la surface recouverte de sel⁶⁰. Cette méthode fut d'ailleurs adaptée pour les travaux présentés dans ce mémoire.

D'autres métaux que l'or et l'argent ont d'ailleurs été étudiés pour leur capacité à agir en tant que matrice métallique. Entre autre, une combinaison de platine et de DHB a permis la détection des PC et des PE dans des cerveaux de rat⁶⁵. Par ailleurs, Hansen et al. ont effectué une étude comparative de 6 métaux déposés par pulvérisation métallique comprenant l'argent, l'or, le cuivre, le nickel, le platine et le titane afin d'évaluer la performance individuelle de chacun de ces métaux envers plusieurs classes de molécules solubles et non solubles dans l'eau telles que des acides aminés, des sucres, des lipides neutres et des PLs⁵⁹. Entre autres, leurs conclusions montrent que les métaux nobles tel que l'argent, l'or et le platine sont généralement beaucoup plus efficace pour les métabolites et les lipides neutres que les matrices organiques traditionnelles. En plus, ils ont montré que bien que les métaux puissent permettre la détection de certains PLs, ils sont généralement beaucoup moins efficaces comparativement aux matrices organiques couramment utilisés⁵⁹.

1.7. La désorption-ionisation laser assistée par surface (SALDI)

La désorption-ionisation laser assistée par surface (SALDI) est une méthode d'ionisation similaire au MALDI, mais où la matrice utilisée, traditionnellement de petites molécules organiques, est remplacée par des substrats à l'échelle nanométrique sur lesquels sont déposés les analytes.

Selon une récente revue de la littérature publiée par Muller et al. faisant état de la grande diversité de sous-méthodes et de techniques utilisés en SALDI, ces nanosubstrats sont généralement des nanoparticules colloïdales, des plateformes de nanostructures ou des dépôts métallique préparés par pulvérisation métallique (sputter)⁶⁶. Muller et al. ont d'ailleurs mis de l'avant un très grand nombre de noms et d'acronymes impliquant une ionisation de type SALDI. La définition la plus générale implique que toutes les matrices ou structures nanométriques utilisées dans une approche de désorption laser sont considérés comme des processus SALDI et ce, que les nanomatériaux soient présents comme substrat en dessous de ou par-dessus l'échantillon comme le serait les matrices classiques. Dans les travaux présentés dans ce mémoire, seuls les conditions impliquants les nanomatériaux en tant que substrats seront considéré comme des approches SALDI.

1.7.1. Historique de l'analyse par SALDI

Les premières analyses de désorption laser assistée par surface remontent aux analyses fondatrices effectuées par Tanaka et al en 1988⁶⁷ qui ont utilisé des nanopoudres de cobalt de 30 nm de diamètre mélangé à du glycérol afin d'ioniser des mélanges de peptides et de protéines. Ces travaux ont mené au développement du MALDI maintenant largement utilisé. En 1999, Wei et al. ont publié une nouvelle méthode permettant de désorber les analytes suite à une impulsion laser, mais sans utiliser de matrice ou de poudre métallique. Il utilisait une nanostructure de silicium (DIOS) comme surface d'analyse⁶⁸. Ce fut le début de la propagation des analyses SALDI MS.

1.7.2. Intérêt envers l'approche SALDI

Les approches de types SALDI proposent plusieurs avantages autant en profilage qu'en IMS. En effet, ces approches bénéficient de l'absence de la matrice organique normalement utilisée en MALDI. Par ailleurs, il n'est pas rare que les signaux de matrices contaminent les spectres de masse suivant la formation d'agrégats de matrice chargés. Ces signaux augmentent le bruit des

spectres de masse et limitent la détection des analytes désirés lors de superposition des signaux. Par ailleurs, l'absence de matrice augmente la reproductibilité des analyses en limitant la présence de points chaud (*hot spots*) due à la co-cristallisation difficile de certaines matrices avec les analytes⁶⁶. Les surfaces utilisées en SALDI doivent posséder les mêmes caractéristiques fondamentales que les matrices utilisées en MALDI. En effet, ces surfaces doivent absorber à la longueur d'onde du laser et provoquer la désorption - ionisation des analytes désirés. Bien que les mécanismes d'ionisations SALDI diffèrent de ceux proposés en MALDI, il s'en suit une expansion supersonique et une ionisation généralement monochargé des analytes. De plus, plusieurs surfaces différentes ont été développées permettant d'ioniser diverses catégories d'analytes. Entre autres, les substrats composés de nanoparticules métalliques⁶⁹, les micro-réseaux de colonnes de silicone⁷⁰ (nanopost array), les structures de silicone ainsi que les surfaces homogènes métalliques sont les plus populaires⁶⁶. L'ensemble de ces motivations ne font qu'éveiller l'intérêt des recherches envers les surfaces et des dépôt métalliques nanométriques utilisés dans les travaux présentés dans ce mémoire.

1.8. Le rein

Le rein est un organe central dans le maintien homéostasique du corps. Il participe activement à la régulation de l'eau et des sels inorganiques, à l'extraction des substances exogènes et métaboliques du sang et à leurs excrétion dans les urines, à la néoglucogénèse et au maintien de l'équilibre acido-basique du sang⁷¹. Le rein est composé de plusieurs histologies distinctes montrées dans la figure 1.10. Entre autres, on distingue le cortex rénale, la médulla ainsi que le bassinnet⁷¹. En soi, le rein n'est pas un organe particulièrement gras.

En revanche, il arrive que du gras viscéral enrobe le rein et soit très difficile à retirer lors de la dissection sans physiquement altérer le rein. Le tissu adipeux viscéral (*visceral adipose tissue VAT*) est principalement localisé dans la région abdominale et plus principalement autour du mésentère et grand omentum. Il est structurellement et physiologiquement différent du tissu adipeux sous-cutané et est un plus grand prédicteur de mortalité que ce dernier⁷². Le gras viscéral est principalement formé de cellules adipocytes comprenant de grandes réserves de TAGs. Le

tissu adipeux viscéral n'étant pas fixé aux sections tissulaires, la couche de gras fond lorsque les sections tissulaires sont montées sur les lames d'analyses et les TAGs migrent sur et hors sections. Le rein sera donc utilisé comme principal tissu modèle afin d'étudier la délocalisation du gras viscéral et les effets de suppression ionique sur différentes familles de phospholipides.

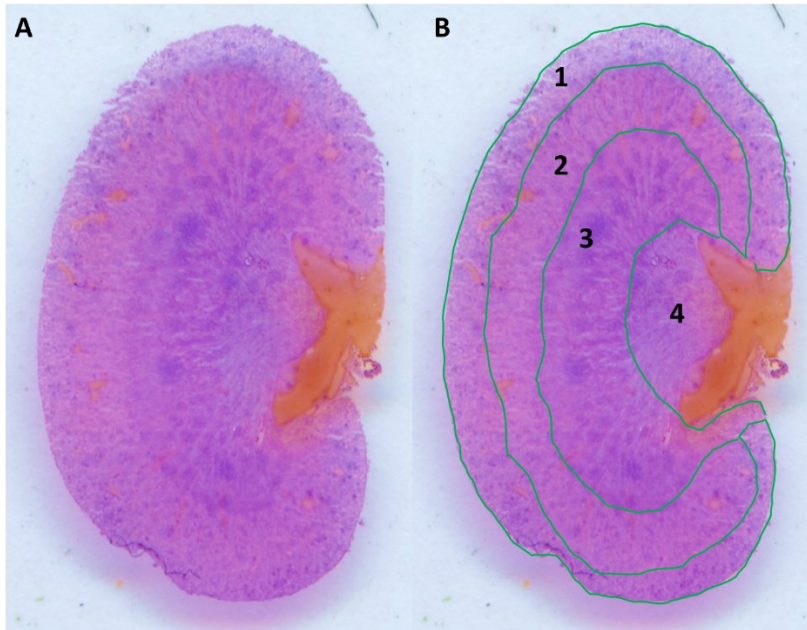


Figure 1.10 : Coloration à l'hématoxyline et à l'éosine d'une section de rein de 12 μm d'épaisseur. (A) coloration sans annotations et (B) image avec annotations des régions histologiques principales du rein où 1) cortex, 2) médulla externe, 3) médulla interne et 4) bassinnet.

1.9. Objectifs de recherche

Toujours dans l'optique d'améliorer la qualité des résultats obtenus en IMS, il est primordial de s'intéresser à la délocalisation des espèces endogènes et exogènes lors des analyses d'imagerie. La délocalisation des espèces peut avoir lieu pendant les étapes de préparation des échantillons tel que les lavages des sections tissulaires, l'application de matrice et les temps d'attentes. Lors des lavages, l'utilisation de solvants organiques permet de retirer les lipides afin d'augmenter la sensibilité envers les protéines sans délocaliser ces dernières⁷³. En comparaison, les lavages aqueux permettent de bien retirer les différents sels endogènes présents dans les tissus et

d'augmenter la sensibilité des analyses de plusieurs groupes de lipides^{38, 74}. Le choix des solutions est crucial afin d'enlever les interférents sans engendrer la délocalisation des analytes d'intérêt.

Dans la même optique, l'application de matrice sans solvant à l'aide de méthodes telle que la sublimation ou la pulvérisation métallique diminue la délocalisation des espèces puisqu'aucun solvant permettant la solubilisation des lipides n'est employé. Par ailleurs, le choix de solvants lors d'application de matrice par nébulisation pneumatique doit être effectué avec précaution et plusieurs analyses de contrôle confirmant l'absence de délocalisation des analytes désirées doivent être effectuées.

Par ailleurs, le gras viscéral peut aussi être un vecteur de délocalisation très important menant à de forts effets de suppression ionique envers d'autres espèces présentes dans les sections tissulaires⁶⁰. Cela peut être un problème très important lors d'analyse de sections tissulaires bordées de gras viscéral comme le rein, la médulla surrénale ou certain tissus cancéreux reconnus comme graisseux tel que le cancer du sein.

Trois problèmes majeurs surviennent lors d'analyses de sections tissulaires bordées de gras viscéral. Premièrement, les TAGs s'ionisent préférentiellement et provoquent un fort effet de suppression ionique sur les autres espèces lipidiques. En 2016, Dufresne et al. ont montré le fort effet de suppression ionique des TAG sur les ester de cholestérols⁶⁰ situés en bordure des sections tissulaires. De plus, la forte abondance de gras semble affecter la structure de la couche de matrice et limiter l'ionisation des molécules là où le gras est très abondant. Finalement, le gras viscéral provoque la délocalisation d'autres espèces initialement présentes dans le rein par un effet de migration. La combinaison de ces trois situations diminue la qualité des analyses d'IMS et il n'est plus possible d'attribuer les résultats d'IMS à des régions histologiques précises

Les travaux présentés dans ce mémoire s'inscrivent dans la continuité de la volonté d'obtenir des résultats d'IMS de plus en plus fiables et permettant d'augmenter la corrélation des résultats d'IMS avec les histologies sous-jacentes des sections tissulaires minces analysées. Afin d'y parvenir, nous étudierons les surfaces sur lesquelles les sections tissulaires minces sont déposées. L'objectif de ces travaux est de développer des surfaces permettant de diminuer la délocalisation du gras viscéral sur et hors section. Ces effets sont pernicieux et peuvent facilement fausser

l'interprétation des données pour un analyste non-éclairé. À la suite de la publication de nos premiers travaux, un autre groupe a proposé une solution alternative à ce problème. Ils mentionnent l'utilisation de ruban adhésif au carbone double face comme solution afin de limiter la délocalisation des espèces⁷⁵.

Chapitre 2 – Minimizing Visceral Fat Delocalization on Tissue Section with Porous Aluminum Oxide Slides for Imaging Mass Spectrometry

Article soumis au journal Analytical Chemistry le 16 décembre 2019 et publié le 8 mars 2020

Frédéric Fournelle¹, Ethan Yang¹, Martin Dufresne² and Pierre Chaurand¹

¹ Department of Chemistry, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada, H2V 0B3

² Mass Spectrometry Research Center, Vanderbilt University, Nashville, TN 37205, USA

Contribution de chacun des auteurs

Frédéric Fournelle : Développement et mise en place du protocole expérimental, acquisition des données, analyses de données, préparation des figures et rédaction du manuscrit.

Ethan Yang : Aide à la mise en place du protocole expérimental et à la rédaction des scripts de traitement de données. Support à la rédaction sous forme de corrections linguistique et structurale.

Martin Dufresne : Réalisation des expériences préliminaire avec les lames d'aluminium oxydées

Pierre Chaurand : Supervision des travaux et aide à la rédaction et révision du manuscrit

2.1. Abstract

High correlation of bioanalytes with their corresponding histologies is the landmark feature of matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) imaging mass spectrometry (IMS). Lipids are one of the most studied classes of biomolecules, and monitoring lipid distribution and abundance in tissue samples can lead to major inputs in the understanding of disease. Lipid delocalization and ion suppression are two major effects that can lead to misinterpretation of the IMS results to an unaware analyst. We and others have observed that tissue specimens containing high amounts of visceral fat are challenging to analyze because of fat delocalization on and off section leading to significant triacylglyceride and phospholipid delocalization and major ion suppression effects. In this work, we introduce a novel and easy to produce reusable porous aluminum oxide sample slide that minimizes visceral fat delocalization after thaw-mounting of tissue sections. Using fatty mouse kidneys and other tissues, we demonstrate its efficacy in minimizing delocalization of triacylglycerides, the primary constituents of fat, and the resulting beneficial effects on phospholipid MALDI IMS.

2.2. Introduction

Lipids are an essential class of biomolecule for life. More than just the main component of the cellular membrane⁵⁰, they play significant biological roles such as cell signaling⁵¹, energy storage⁷⁶ and cell adhesion⁵². Because of their importance in living organisms, they have been studied through a wide variety of separation methods such as thin layer chromatography (TLC)⁷⁷, capillary electrophoresis⁷⁸ and supercritical fluid chromatography⁷⁹. Each of these separation methods has their pros and cons^{80, 81}. Of all detection methods, mass spectrometry (MS) remains the most widely used and one of the more powerful techniques for both qualitative and quantitative lipid analyses⁸². In these experiments, the samples are typically subjected to a chromatography separation method such as liquid (LC)⁸³ and gas chromatography (GC)⁸⁴ before analysis by MS. Although these methods help to reduce matrix effects as well as separate lipid isomers⁸², this extra process can be time-consuming and arduous. Further, these approaches require the homogenization of samples into a liquid, thereby losing spatial localization of the analytes within the original tissue sample^{85, 86}. Imaging MS (IMS) is a powerful technique that conserves the spatial information by analyzing thin tissue sections of biological samples in a 2D array grid at a predefined spatial

resolution^{87, 88}. MALDI IMS has increasingly been used to determine the distribution of lipids in tissue^{89, 90 91}.

With the development of new matrices^{13, 55, 92, 93} and sample preparation methods to enhance sensitivity and selectivity of a targeted class of biomolecules^{94, 95}, MALDI IMS has continued to push the limits in its ability to associate lipid IMS distributions with the underlying histology. From the earliest years of IMS, this correlation between histology and IMS has been crucial. To this end, methods to either perform classical histological staining before⁵⁵ or after IMS analysis⁹⁶ have been developed. More recently, Patterson *et al* have developed a new approach to directly correlate IMS results and histology through auto-fluorescence microscopy, achieving alignments within 5 μm of the true position⁹⁷. All these efforts to develop new tools to improve correlation of IMS results and histology are useless if analytes delocalize before and/or during IMS analysis. While it is generally known that wet matrix application approaches such as spray deposition can lead to delocalization, little is known with regards to how compounds behave after dry matrix application approaches such as sublimation. Previous results have shown that all major classes of lipids migrate vertically (upwards) into the sublimated matrix layer over time³⁹ without major lateral diffusion and obvious delocalization. However, should lipids delocalize laterally in sublimated matrix, this phenomenon would lead to the false attribution of lipids to a mismatching histology and to gross misinterpretation of IMS results. Further, delocalization of some lipid species may lead to significant ion suppression⁹⁸. For example, Dufresne *et al* showed that triacylglycerols (TAGs) have a major ion suppression effect on cholesterol esters⁶⁰. In this example, the TAGs originated from visceral fat found on the edges of the tissue sections. Despite careful attention to remove this excess fat, TAGs were observed migrating inward throughout the section. In certain cases where the fat is an integral part of the sample, for example in some skin or breast cancer samples, it is impossible to remove. Other strategies are therefore required to combat fat delocalization. To understand and combat this delocalization phenomenon, we focused on characterizing the surface properties of the surface the tissue sections are thaw-mounted on for eventual MALDI MS analysis, as well as the influence of all of the processing steps in between.

Multiple different slides have been used for MALDI IMS. Currently, glass microscope slides are widely used for their low cost and transparency and a thin coating of ITO is added when electrical conductivity is needed such as for time-of-flight (TOF) instruments⁹⁶. Several types of new

surfaces have been proposed to increase sensitivity and selectivity of analytes. In 1999, Wei *et al* demonstrated the potential of porous silicon-based slides to trap analytes and facilitate ionization of small molecules and decrease background noise ⁶⁸. Poly-lysine coated ITO-coated glass slides have also been widely used to increase section adherence and were found to be compatible with MALDI IMS ⁹⁹. The effect of nanostructure surface on the ionization process was first investigated by Tanaka *et al* who used a suspension of cobalt nanoparticles in glycerol to analyze proteins up to 100 000 Da ⁶⁷. Since then, surface-assisted laser desorption ionization (SALDI) has been developed using various metals and nanoparticles ¹⁰⁰ allowing detection of multiples analytes such as lipids ¹⁰¹, peptides ¹⁰² and small molecules ¹⁰³. More recently, Kancharla *et al* performed an extensive MALDI MS study of various metal transmission electron microscope grids to understand their effects in enhancing peptide signal intensity ¹⁰⁴.

In this work, we present the development of a novel porous aluminum oxide slide that drastically minimizes TAG delocalization on and off-tissue sections, thereby minimizing ion suppression effects on phospholipids (PL) in MALDI IMS experiments. These porous aluminum oxide slides can be easily prepared in-house, used on both sides and even be reused numerous times. To improve our understanding of PL ion suppression, we first analyzed an artificial tissue prepared from a fat-free kidney homogenate on which we spotted a visceral fat homogenate after sectioning and thaw mounting. We then assessed the actual effects of visceral fat delocalization using fatty mouse kidney and fat-marbled beef tissue sections. Minimal visceral fat delocalization on the porous aluminum oxide slide allowed for a greater correlation with the corresponding tissue histology, improving the overall quality of IMS analyses.

2.3. Materials and Method

Chemicals and Reagents

All HPLC grade solvents, sodium acetate (NaAC), sodium carbonate (Na₂CO₃) and sodium bicarbonate (NaHCO₃) were purchased from Thermo Fisher Scientific (Ottawa, ON). 1,5-diamoninaphthalene (DAN) was purchased from Sigma-Aldrich Canada Ltd. (Oakville, ON). Gold and silver sputter targets were purchased from ESPI Metals (Ashland, OR).

Tissue sampling and sectioning

Fresh frozen kidneys were obtained from 12-week-old mice after protocol approval by the local Ethics Committee of the Université de Montréal. To minimize molecular deterioration, kidneys were removed from animals immediately after CO₂ euthanasia, loosely wrapped in aluminum foil and frozen on dry ice. A block of lean kidney homogenate was prepared from fifteen fat removed kidneys as per the adapted protocol described in Groseclose *et al* for liver¹⁰⁵. Briefly, after gently scraping off the exterior visceral fat, the kidneys were entirely cut at a thickness of 70 µm using a Leica CM 3050 cryostat (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) and all sections were then mechanically sheared by four steel balls in a 2 mL Eppendorf using a vortex agitator for 30 min, alternating between 30 s of agitation and 30 s on ice. No liquid has been added to the homogenate. An 8 mm wide straw was inserted into the homogenate and frozen on dry ice. The straw was then removed from the Eppendorf and mounted on a cryostat target head for sectioning. Sections were cut longitudinally across the homogenate with no interference from the straw. The straw plastic edges bordering the tissue sections were removed before thaw-mounting. This protocol allowed for reproducible rectangular sections. A second homogenate was generated using the fat that was trimmed from the kidneys following the same protocol. This fat homogenate was centrifuged at 10 kRPM for 30 s and then plunged into an ice bath for 2 min, repeated ten times. A third homogenate was generated using highly fatty mouse kidneys following the same protocols to produce a high fat kidney homogenate. This fat homogenate was also frozen inside an 8 mm straw. All kidney sections were cut at 12 µm thickness, while the kidney and fat homogenates were cut at 20 µm thickness. For all sectioning, the chamber temperature was maintained at -25°C and the specimen temperature at -18°C. After sectioning, thin tissue sections were thaw-mounted on the chosen slide and desiccated for ~1 h prior to subsequent experimentation. For MALDI IMS, sections were stained following a standard established H&E protocol (**Supplemental table 1**) post-IMS; for CBS-AuLDI IMS, serial sections were collected, mounted on standard microscope glass slides and H&E stained.

Aluminum oxide slide anodization

High purity aluminum sheets (grade 6061-T6) were cut to size (75 x 25 mm). Before use, each slide was gently sanded for 5 min with a 400-grit sandpaper on a marble plate to remove oxides and scratches present on the surface. Special care was taken to avoid warping the slides since deviation from planarity will lead to mass shifts observable by TOF MS. After sanding, the

aluminum slides were submerged in boiling water for 30 s to remove dust and any possible contamination, then wiped dry with tissue (Kimwipe). One end of the slides was then wrapped in parafilm to prevent oxidation, which creates the risk of electrically isolating the slide from the slide holder. The end not covered in parafilm was then attached to an alligator clip connected to the positive terminal of a potentiostat. The slides were then oxidized following one of two protocols to obtain either a barrier type (BAR) oxide layer or a porous type (POR) oxide layer^{106, 107}. To obtain a porous type aluminum oxide, the slides were plunged in a 15% sulfuric acid solution with a potential of 8 V. Four different anodization time were analyzed (10, 20, 30 and 40 min). Solutions may become slightly pink while undergoing oxidization due to possible manganese contaminant present in 6061-T6 grade aluminum¹⁰⁸. To obtain a barrier type aluminum oxide slide, the slides were plunged into 3% tartaric acid (Sigma) solution at pH 5.5 for 10 min at 4 different potentials (30, 40, 50 or 60 V). As explained by Chen *et al*¹⁰⁶, to obtain a barrier type oxide, pH should be adjusted to pH 5.5 with ammonia to ensure that no ions in solution can solubilize aluminum oxide¹⁰⁶. In all cases, an aluminum rod was used as a counter electrode (12 x 0.8 x 1.8 cm). At the end of anodization process, the slides were removed from the anodization solution, submerged in boiling water for 30 s, passed under cold running water for 30 s and dried under a stream of nitrogen. **Supplemental figure 1** summarizes the entire protocol for both anodization methods.

Surface characterization

Contact angle measurements were acquired on a custom-built instrument. Optical zoom and background were optimized for each slide to maximize contrast. Contact angles from ten individual droplets of 4 μ L Milli-Q water placed on the slides were measured and an average value was derived. The contrast was adjusted when necessary to maximize visual separation of the droplet border and background. Results were exported to Microsoft Excel for statistical analysis and data visualization. Contact angle analysis was performed with ImageJ¹⁰⁹ (Version Win-64). The image type was adjusted to 8-bit while the image threshold was adjusted to maximize precision before processing the image with outline binary process. Contact angles measurements were obtained with the *Contact Angle* plugins after contrast optimization.

Scanning electron microscopy (SEM) analyzes were performed using a JSM-7400F system (Jeol Peabody, Tokyo, Japan) at 2 kV and measurements were taken at 16 000X magnification.

Metal sputter deposition

All metal sputter depositions were conducted on a Cressington 308R sputter coater from Ted Pella Inc. (Redding, CA, USA) at an Argon partial pressure of 0.02 mbar. Silver was sputtered for 45 s at 80 mA to produce a ~19 nm layer. Gold sputtering was preceded by the spray deposition of a thin layer of sodium carbonated buffer as recommended by Dufresne *et al*⁶⁰ (see Section “Carbonate buffer and matrix spray deposition”). Gold was deposited for 40 s at 40 mA to produce a ~28 nm layer.

Systematic analysis of delocalization

To optically determine the regions affected by fat delocalization, sections from high fatty kidney were cut, thaw mounted and placed inside a vacuum desiccator within 10 min. After 1 h in vacuum, slides were inserted inside the metal sputtering system within 10 min and pumped for 30 min before initiating silver deposition. The slides were then scanned at high resolution (2400 dpi) within 10 min of the silver deposition. To characterize the effects of vacuum on fat delocalization, sections from the high fat kidney homogenate were cut, thaw-mounted on ITO-coated slides and submitted to ambient or a weak desiccator vacuum for 180 min. High-resolution optical scans were processed with ImageJ (Version Win-64) and fat delocalization areas were determined with the polygon selection function.

Carbonate buffer and matrix spray deposition

All spray depositions were performed on a first-generation TM-Sprayer (HTX Technologies, Chapel Hill, NC). Sodium carbonated buffer solution (CBS) of 7:3 H₂O:ACN (v:v) with 85 mM sodium carbonate (Na₂CO₃), 85 mM sodium bicarbonate (NaHCO₃) and 250 mM sodium acetate (NaAc) was sprayed onto the tissue sections before gold sputtering to maximize the intensity of TAGs based on the protocol described by Dufresne *et al*⁶⁰. The instrumental parameters for the CBS deposition are as follows: 15 passes at a 7.0 mm of track spacing, 3.5 mm offset for even passes, a flow rate of 13.5 mL/h, a track velocity of 3450 mm/min, a dry time of 12 s between each pass, a spray pressure of 20 psi and temperature of 55°C. The solution of 1,5-diaminonaphthalene (DAN) matrix (10 mg/mL in 1:1 ACN:H₂O and 0.1% TFA) was sprayed with the following protocol: eight passes at 4.0 mm track spacing, 2.0 mm offset for even pass number, flow rate 8.0 mL/h, track velocity 1200 mm/min for 8 passes, dry time 6 s between each pass, spray pressure 20 psi and temperature 45°C.

Matrix sublimation

DAN was also deposited by sublimation using a sublimation chamber (Chemglass Life Science, Vineland, NJ) as previously described⁵⁵. Sublimation was performed between 4 to 5 min at 180°C under a 0.5 mbar vacuum to achieve a density of about 120 µg/cm² to maximize S/N ratio for MALDI IMS of phospholipids.

MS and IMS data acquisition and analysis

All mass spectrometry analyses were performed on an ultrafleXtreme MALDI time-of-flight (TOF/TOF) MS instrument (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA) equipped with a 1-kHz SmartBeam II Nd:Yag/355-nm laser with approximately 15 µm diameter in the “small” focus setting. Analyses were performed in either linear or reflectron mode with an acceleration voltage of 25 kV in positive ion mode and 20 kV in negative ion mode. For each experiment, delayed extraction parameters, laser energy, detector gain voltage and all other instrumental parameters were optimized to maximize S/N of phospholipids and TAGs. To prevent capacity effects on the aluminum oxide slide, it is suggested to work at lower data acquisition speed. A 333 Hz laser repetition rate was used to acquire the IMS results in **Figure 5**, while 1000 Hz was set for all other analyzes. MS and IMS results were visualized with flexAnalysis 3.4 and flexImaging 4.0, respectively, (Bruker Daltonics, Billirica, MA) without data normalization. Data were exported in the R environment (v 3.4.4) for further processing with the Cardinal¹¹⁰ (v 2.1) and MALDIquant¹¹¹ (v 1.19.3) package. Intensity of selected *m/z* of all pixels in the selected region were extracted and pixels from the top and bottom 10% intensity were discarded to eliminate hot spots and empty pixels. For each selected *m/z* values, all remaining intensities were summed for further statistical analyses.

2.4. Results & Discussion

Ion suppression effects on phospholipids induced by visceral fat delocalization

To understand the ion suppression effects linked to visceral fat delocalization, sections from a kidney homogenate prepared with minimal visceral fat were spotted with approximately 0.5 µL of fat homogenate after thaw mounting (**Figure 1**). For all analyses, one section was used as a reference (without fat added) and a serial section was doped with fat extract. As can be seen in **Figure 1, panels B&C**, the major phospholipid (PL) signals detected on the reference sections

were consistent throughout the entire section. The sections with a drop of visceral fat homogenate, however, displayed a strong decrease in PL signals in the visual fat delocalization zone (FDZ, circled in red), which is detailed in **Supplemental figure 2**. Ion suppression was particularly intense for m/z 734.5 (positive mode) and m/z 738.6 (negative mode), where a 40-fold and a 19-fold decrease in intensity were respectively observed between the fat deposition spot region circled in white and the reference region circled in green. Interestingly, ion suppression effects were generally more intense in the negative ion mode rather than the positive ion mode. For all species, the decrease in signal intensity continues beyond the FDZ into a non-visible FDZ. This observation suggests that differential molecular delocalization occurs without leading to any obvious visual changes in the matrix layer. The presence of triacylglycerols (TAGs) from the visceral fat in the non-visible FDZ supports this observation (**Figure 1, panel A**). Finally, it may be puzzling that within the FDZ, no TAG signals were detected despite their high levels. The answer may reside in the shift in the absorption band of the gold aggregates formed during metal sputtering in the presence of high fat content from ~ 350 nm to ~ 520 nm^{60, 112}. This was visually confirmed by the strong red hue after gold deposition. This shift in the absorption spectrum caused by the aggregation of gold atoms therefore hinders the ability of the gold layer to absorb the wavelength of the tripled Nd/YAG laser (355 nm) and adversely affects the LDI process thus reducing observable signal in the red areas.

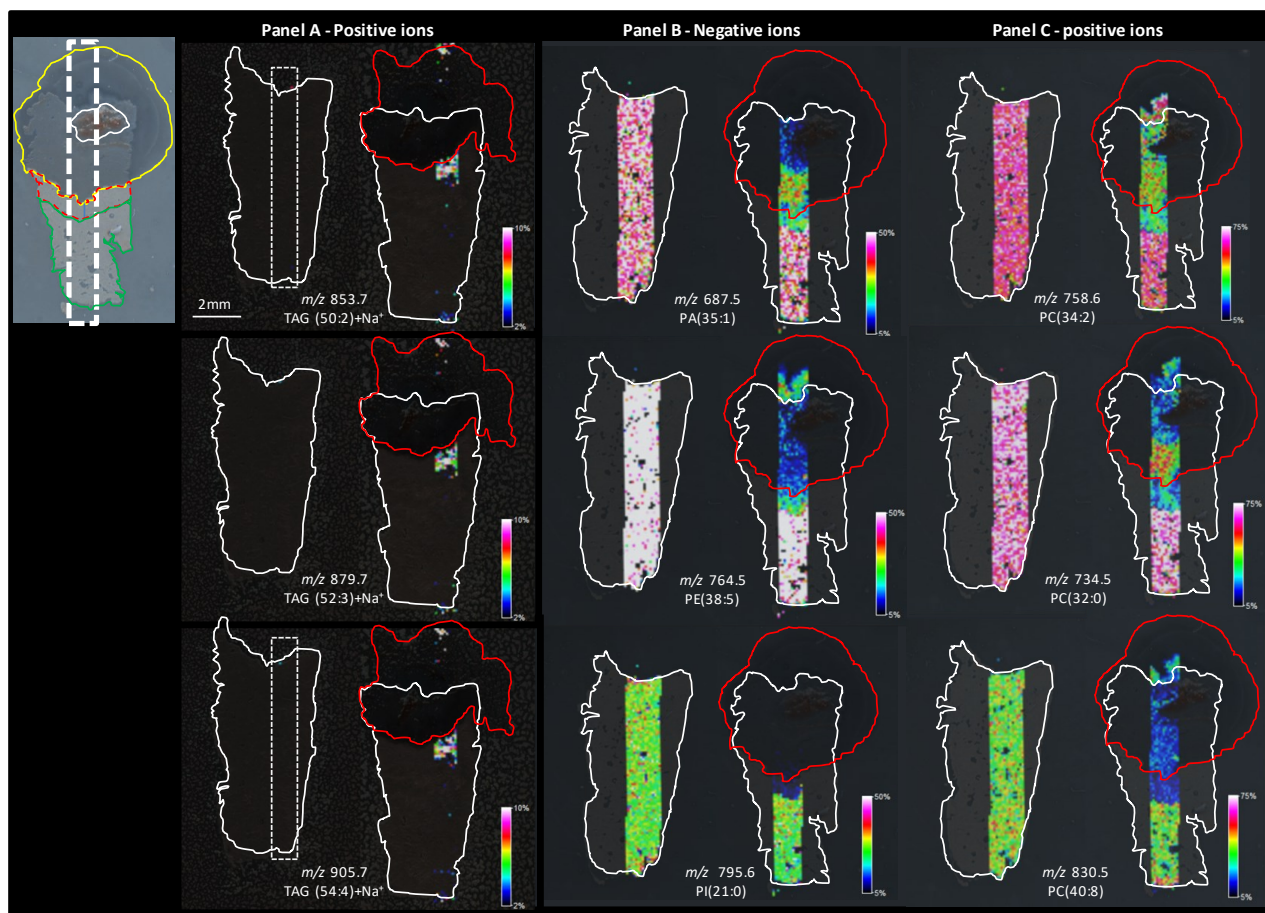


Figure 2.1 : Molecular characterization of fat delocalization by IMS using fat-free kidney homogenate sections with and without fat doping with a lateral resolution of 100 μm . *Panel A represents CBS-AuLDI IMS of TAGs while panels B and C respectively, represent negative and positive mode MALDI IMS of PLs after 1,5-DAN sublimation. For each panel, 0.5 μL of fat extract was spotted on the right sections while sections on the left were used as reference. Upper left image indicates 4 different regions showing visual and molecular differences: (i) the outline in white is the initial region where the fat extract was spotted, (ii) the outline in yellow represents the visual FDZ determined by the color change of the matrix, (iii) the outline in red represents the non-visual FDZ and (iv) the outline in green is the reference area not affected by TAG delocalization.*

MALDI IMS substrate selection

As discussed previously, the delocalization of visceral fat into surrounding tissues may lead to serious misinterpretation of IMS results due to its ion suppression effects on PLs. One possible approach to minimize this phenomenon is to modify the surface on which the sections are mounted. For these studies, we used a mouse kidney model that had naturally occurring visceral fat bundles. After sectioning and thaw-mounting, we compared the amount of fat delocalization from the

bundles into the kidney sections. We used ITO-coated glass slides as reference and compared fat delocalization by IMS for serial sections mounted on standard microscope glass slides, Superfrost™ glass slides, gold-coated glass slides as well as on three different types of aluminum slides (non anodized, anodized porous type and anodized barrier type). Very high fat kidneys, as shown in **Supplemental figures 3&9**, were used to enhance the positive or negative effects of each of the tested surfaces. The pairwise comparison accounts for the variability in fat that may exist from section to section and minimizes differences in the starting amount of fat. To visually observe the area of fat delocalization, a thin layer of silver was deposited onto the samples because silver, like gold, will form aggregates in the presence of visceral fat and appear yellow¹¹³. This approach was chosen because it was found to be more reliable than the change in color induced by fat migration after matrix sublimation. Comparison of fat and TAG delocalization is presented in **Supplemental figure 3**. Serial sections were used for optical fat delocalization measurements after silver sputtering and TAG delocalization after CBS-AuLDI IMS. While possibly not as precise as IMS, optical evaluation after silver sputtering is an appropriate and convenient method to screen a large selection of surfaces for rapid assessment of on-section fat delocalization. **Figure 2** shows the fat delocalization results from the 13 slides tested after silver sputtering. Triplicate analyses of the various surfaces indicated that the SuperFrost™ glass slides, microscope glass slides and gold slides do not show major improvements over ITO-coated glass slides. Non-anodized and barrier type aluminum oxide slides worsened the delocalization by at least two-fold and up to five-fold. As the average amount of tissue covered by visceral fat after thaw mounting on ITO was ~15%, the results indicated that up to 75% of the tissue sections deposited on the non-anodized aluminum slides was covered in visceral fat. On the other hand, porous type aluminum oxide slides showed a clear decrease in fat delocalization. The greatest improvement was observed on porous type aluminum oxide slides after 20 min (POR-20 min) of anodization time, with less than 5% of the tissue covered in fat, representing a near 3-fold decrease when compared to ITO-coated slides. In consideration of the vast difference in performance among all the slides, particularly amongst the different aluminum slides, we hypothesized that the surface hydrophobicity and texture may play a role in preventing the extent of fat delocalization. To test our hypothesis, contact angle and SEM images were obtained for the different aluminum oxide slides.

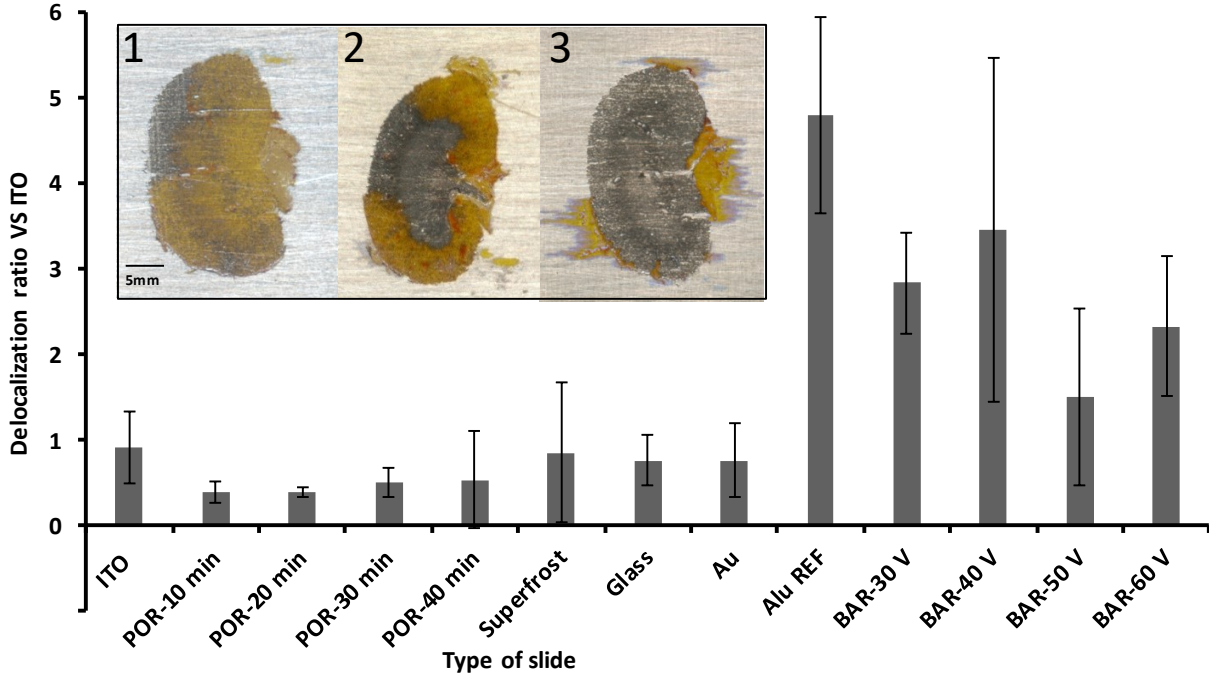


Figure 2.2 : On-tissue fat delocalization observed after silver sputtering for all the 13 slides tested. For each slide type, the delocalization ratio was normalized to that observed for a serial section mounted on an ITO-coated glass slide. Errors bars represent standard deviation ($n=3$) of the ratio after normalization. Photomicrographs showing the yellow aggregates formed after silver sputtering obtained for (1) an aluminum slide without oxidation (Alu-REF), (2) a barrier type aluminum slide (BAR-40 V) and (3) a porous type aluminum slide (POR-30 min). Porous type aluminum slides clearly minimized on-section fat delocalization.

Aluminum oxide slide surface characterization

Contact angle measurements of water droplets were acquired for all slides and SEM images were acquired for all aluminum slides. Contact angle measurements are a quick and easy way to examine the wettability of the surface, which is affected by surface energy and surface roughness. While surface energy is an intrinsic property of each surface that can be modified by molecular changes, surface roughness can only be modified by altering the topography¹¹⁴. The contact angle is calculated starting from the surface at the triple point gas-liquid-surface following Young's equation¹¹⁵.

$$\cos\theta_e = \frac{\gamma_{SV} - \gamma_{SL}}{\gamma_{LV}} \quad (1)$$

Where γ_{SV} , γ_{SL} and γ_{LV} represent solid-vapor, solid-liquid and liquid-vapor surface tensions. Contact angle measurements provide a relative comparison of hydrophobicity and hydrophilicity,

whereby surfaces whose contact angle is above 90° are considered hydrophobic while those whose contact angle is under 90° are considered hydrophilic¹¹⁶. Results are presented in **Supplemental figure 4**. Based on the contact angle measurements, ITO-coated glass slides with a contact angle of $70\pm 5^\circ$ can be considered partially hydrophilic. Gold-coated, SuperFrostTM, glass and all porous type aluminum oxide slides have significantly lower contact angle values, meaning that they are much more hydrophilic than ITO-coated glass slides. Based on the results from **Figure 2**, all these slides performed better than ITO-coated glass slides upon visual examination after silver sputtering, suggesting a positive correlation between delocalization and hydrophobicity. This is further supported by the contact angles of freshly sanded aluminum and all barrier type aluminum slides. At over 80° of contact angle, these slides are more hydrophobic and demonstrated more delocalization than ITO-coated glass slides. Interestingly, despite barrier type and porous type aluminum oxide producing the same Al_2O_3 oxide surface¹⁰⁷, they showed vastly different hydrophilicity. Differences in fat delocalization behavior is then most likely due to the structural differences between the oxide layers that are formed. Porous type oxide slides were anodized in diluted sulfuric acid, which dissolves aluminum oxide throughout the anodization process¹⁰⁷. This leads to the formation an array of holes and major changes in the topography of the structure as shown by SEM images presented in **Supplemental figure 5**. After 10 min of anodization, small holes were formed and major structural changes were observed after 20 min. On the other hand, barrier type aluminum oxide slides were formed in diluted tartaric acid, which does not dissolve aluminum oxide¹⁰⁶. After the surface is completely passivated (after 4 min according to Chen *et al*¹⁰⁶), the surface topography does not change. This process leads to very little changes in the topography, as seen when comparing SEM images of barrier type slides to none-anodized slides. These results support the idea that surface topography plays an important role in the wettability and therefore explains the differences in contact angle measurements between the two types of aluminum oxide slides.

All porous type aluminum oxide slides have shown significant potential to decrease on-tissue fat (TAG) delocalization. In parallel, we also verified that porous type aluminum oxide slides offered equal PL IMS performances with respect to ITO-coated slides. Using sections cut from the fat-free kidney homogenate bloc, we compared PL ion yields from all the tested slides with respect to ITO-coated slides by MALDI IMS after DAN matrix sublimation (**Supplemental figure 6**). An increase in ion yield for PLs was observed in both positive and negative ion modes from 10 to 30

min of anodization time up to a factor of two for 30 min of anodization time (POR-30 min). For all subsequent comparative measurements, POR-30 min slides were used.

Evaluation of triglyceride delocalization by CBS-AuLDI IMS

Serial sections from a highly fatty mouse kidney were thaw-mounted on ITO-coated and POR-30 min slides. Both slides were submitted to the exact same sample preparation protocol⁶⁰. AuLDI IMS results are shown in **Figure 3**. On both slides, intense suppression of Au⁺ signal is again observed in areas with high TAG concentration due to shifts in the absorption wavelength of the gold aggregates. While the region of Au⁺ ion suppression is located only in the hilum region of the section mounted on the POR-30 min slide, the Au⁺ suppression pattern is significantly more extensive for the serial section mounted on the ITO-coated slide (see **Supplemental figure 3** for kidney histology). Fat migration originating from the hilum where high fat amounts were located was visually observed over ~2/3 of the section, resulting in massive Au⁺ ion suppression. This can also be seen by the extensive on-tissue delocalization of TAGs. For the section mounted on the Alu- POR-30 min slide, TAG signals were found partially delocalized in the pelvis region adjacent to the hilum indicating minimal TAG migration throughout the section.

To further investigate the potential of POR-30 min slides in limiting fat migration, we also investigated sections from a raw, fat-marbled beefsteak. A 1 x 2 cm piece of steak was frozen, serially sectioned and thawed mounted on ITO-coated and POR-30 min slides and analyzed by CBS-AuLDI IMS. The results are shown in **Figure 4**. Again, intense Au⁺ ion suppression was observed on both slides where fat is visually present. However, TAG localization is drastically different between both slides. On the ITO-coated slide, fat delocalization appeared to predominantly occur between muscle fibers as TAG signals were intense throughout the entire section. Based on the H&E image, it appears that some fat is also present within the muscle fibers and TAG delocalization from these cannot be excluded. On the other hand, the POR-30 min slide greatly limited TAG delocalization to the edge of the visual fat marbling region. This experiment also confirmed the ability of aluminum porous type oxide slides to minimize visceral fat delocalization starting from either outside or within tissues.

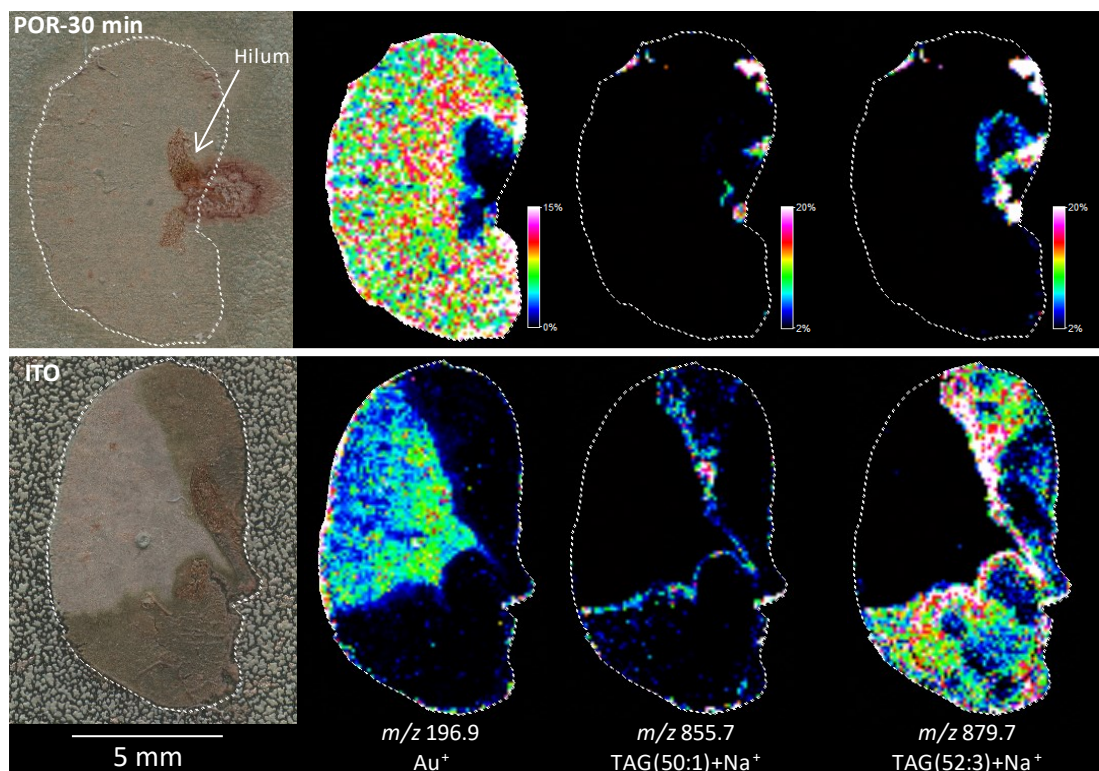


Figure 2.3 : CBS-AuLDI IMS analysis of serial sections from a highly fatty mouse kidney after thaw-mounting on aluminum porous type (POR-30 min) and ITO-coated slides. Results were acquired at 100 μm of spatial resolution. Massive visual fat delocalization is observed on the ITO-coated slide (darker areas) was found anti-correlated to the Au^+ ion image while being exactly aligned with the TAG images. A significant decrease of on-tissue TAG delocalization was observed for the section mounted on POR-30 min porous aluminum oxide slide as confirmed by the TAG ion images.

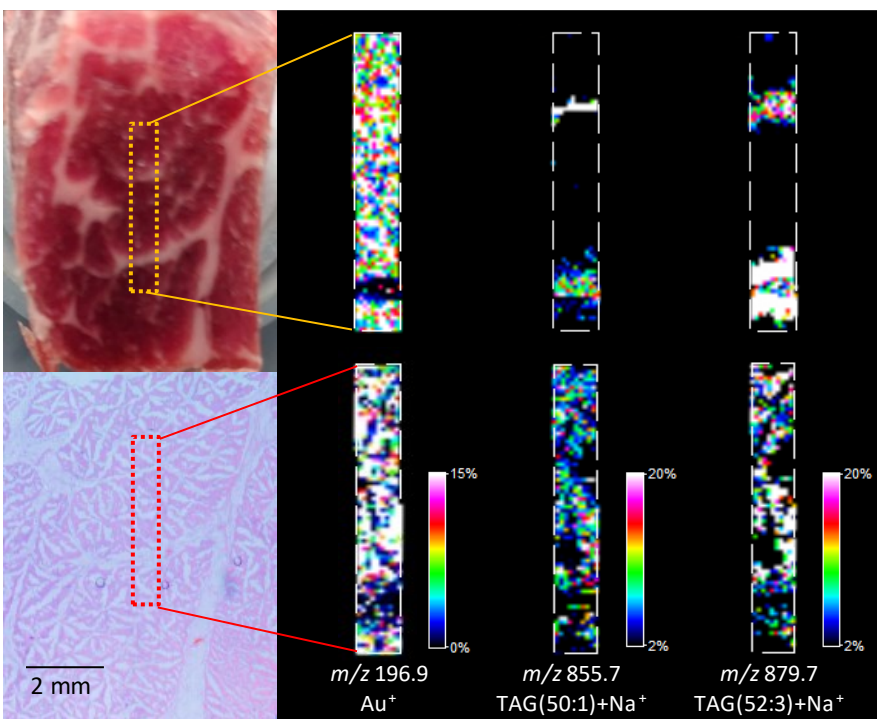


Figure 2.4 : CBS-AuLDI IMS analysis of serial marble beef sections thaw-mounted on porous type aluminum oxide (POR-30 min, top row) and ITO-coated (bottom row) slides acquired with 100 μm of spatial resolution. Extensive TAG delocalization is observed on the ITO-coated slide while minimal delocalization is observed on the POR-30 min slide. H&E staining was performed post IMS on the ITO-coated slide.

Effects of 1,5-DAN sublimation on fat delocalization

The ability of the POR-30 min slide to minimize visceral fat delocalization and the resulting ion suppression effects on PLs was more specifically investigated. Serial sections from a highly fatty mouse kidney were thaw-mounted on ITO-coated and POR-30 min slides and analyzed with positive and negative ion polarities by MALDI IMS after DAN matrix sublimation at 100 μm spatial resolution (**Supplemental figure 7**). In this experiment, the visceral fat surrounding the kidney was not trimmed. Note that the imaged area is larger than the tissue section surface to also assess fat delocalization off tissue. As expected, for the section mounted on the ITO-coated slide, a visual fat delocalization zone (FDZ) is observed over $\sim 1/4$ of the section after DAN sublimation while no visual delocalization is observed for the section mounted on the POR-30 min slide. The matrix signal at m/z 626.2 in the positive ion mode clearly confirms extensive fat delocalization on the ITO-coated slide. However, even if no visual FDZ is visible on the aluminum oxide slide, some

ion suppression is still observed on the edge of the section bordered by the fat bundles (see PE(40:4)) including for the matrix ion, clearly indicating the presence of a non-visible FDZ (also visible on the ITO-coated glass slide where it spreads over half of the section). However, on the aluminum oxide slide, numerous PL signals (such as PC(32:0) and PE(34:0)) displayed their expected distributions in kidney. Interestingly, other PL ions such as PI(38:4) were observed overexpressed in this non-visible FDZ. For the section mounted on the ITO-coated slide, PI(38:4) was also observed delocalized on and off tissue. This delocalization was, however, greatly minimized by the POR-30 min slide. All PL ion signals were formally identified by MALDI MS/MS directly from the tissue sections (see **Supplemental table 2**). These results demonstrate that the POR-30 min slide can partially decrease on-tissue fat delocalization when analyzing highly fatty sections. The presence of a non-visible FDZ after matrix sublimation as compared to CBS-AuLDI suggests that the thin layer of DAN matrix may be acting as a support to allow some of the molecular components of the visceral fat to laterally migrate even if the slide surface is hydrophilic. If this is the case, this effect may be further enhanced by more hydrophobic matrices. Further, we have also observed that visceral fat delocalization to be vacuum and time dependant (see **Supplemental figure 8**). Matrix sublimation is performed under primary vacuum and this process may accelerate fat migration.

Ultimately, we performed a realistic experiment where a second highly fatty kidney was analyzed under the same experimental conditions after carefully trimming off most of the visceral fat surrounding the kidney before sectioning (see **Supplemental figure 9**). A small layer of fat was left on the hilum region to prevent damaging the kidney. The IMS results are shown in **Figure 5**. For measurements performed on the ITO-coated slide, by decreasing the amount of visceral fat, areas initially affected by ion suppression and signal delocalization effects were decreased but can still be observed. Indeed, a visual FDZ is still observed on the ITO-coated slide covering approximately $\sim 1/5$ of the section while not being observed for the section thaw-mounted on the POR-30 min slide. In this case, the matrix signal at m/z 612.3 (positive mode) ion image is fairly homogeneous and shows very little ion suppression effects on tissue indicating minimal fat delocalization. For the section mounted on the ITO-coated slide, most of the PL ion images again either show ion suppression patterns (PC(16:0), PC(32:0)), ion over-expression in the FDZ (PC(37:6), PC(38:4), PE(36:4), PE(40:6), PE(38:6), PI(38:4)) or off-section delocalization (PE(36:4), PE(38:4) and PI(38:4)). However, none of these effects were observed for the section

mounted on the POR-30 min slide and all PLs were found expressed in their expected histological regions. This further emphasizes the ability of the POR-30 min slide to drastically minimize visceral fat delocalization on and off-section allowing more accurate MALDI IMS of PLs.

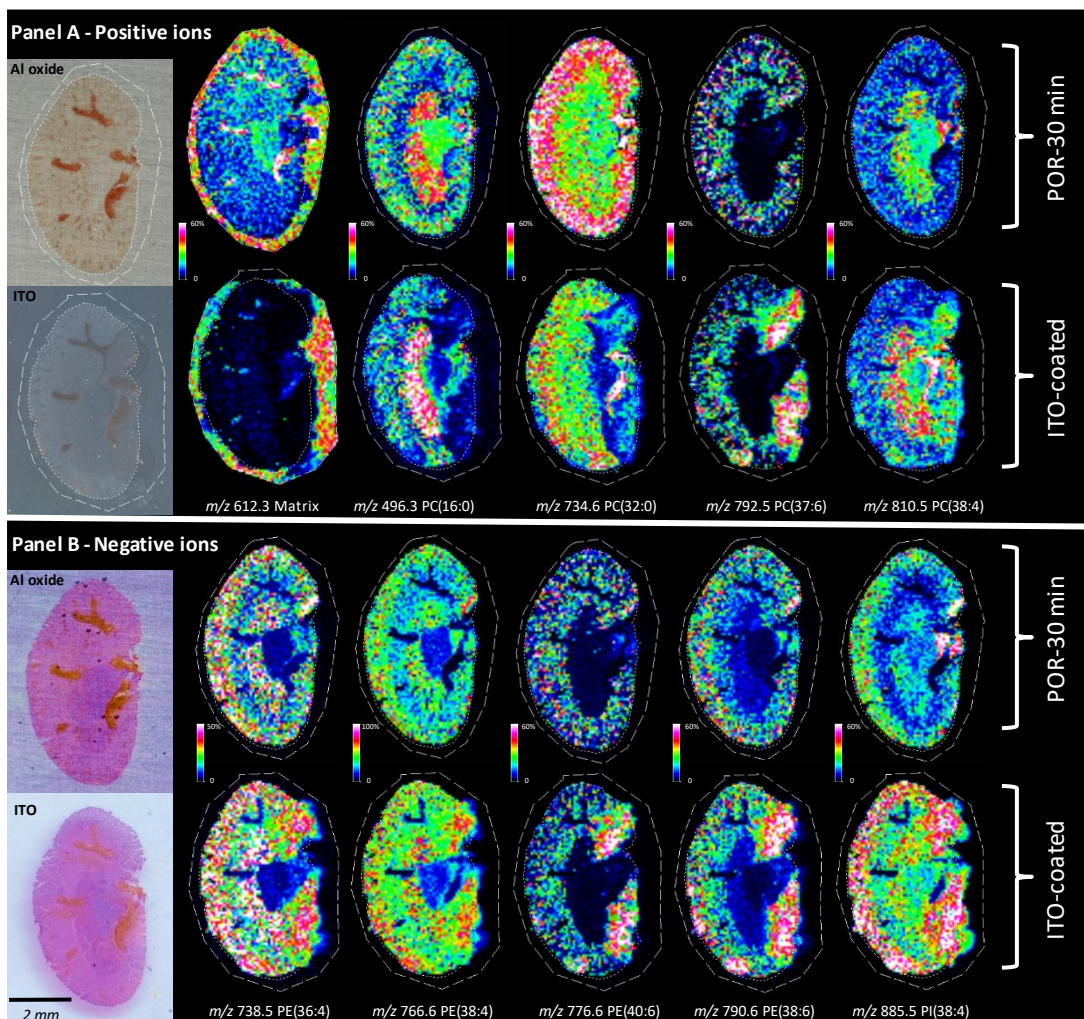


Figure 2.5 : Phospholipid MALDI IMS of serial highly fatty mouse kidney sections mounted on porous aluminum oxide (POR-30 min) and ITO-coated glass slides. *Visceral fat surrounding the kidney was trimmed before mounting the kidney on the sectioning block. Results were acquired with 125 μm of lateral resolution. Panels A and B show positive and negative ion mode results, respectively. Panel A also presents photomicrographs of the sections after 1,5-DAN matrix sublimation where a visual FDZ can be observed on the ITO-coated slide while no visual fat delocalization is observed on the POR-30 min slide. Panel B presents photomicrographs of the same sections after matrix removal and H&E staining. The matrix signal at m/z 612.3 (positive ion) clearly confirms that residual fat delocalization still occurs on the ITO-coated slide even after fat trimming while very limited matrix signals changes are observed on the POR-30 min slide. Extensive ion suppression effects are observed on the ITO-coated slide for PC(16:0) and PC(32:0)*

while PC(37:6), PC(38:4), PE(40:6), PE(38:6) and PI(38:4) are over expressed in the area corresponding to the FDZ. Many PLs including PE(36:4), PE(38:4) and PI(38:4) show delocalization on and off section. However, no ions suppression effects or PL delocalization was observed from the POR-30 min slide allowing clear histological correspondence of all PLs to either the hilum, the medulla of the cortex kidney regions.

Considerations and recommendations for IMS of fatty tissues

As shown in **Figures 1 and 5**, different lipid classes tend to be affected in different ways by visceral fat delocalization. Some PLs are more susceptible to ion suppression effects while others tend to delocalize. As such, major caution should be taken during data analysis when fat delocalization is suspected. The presence of ion spatial distributions non-correlated to histology as well as ion signals detected off-tissue should raise concern. For kidney, the amplitude of fat delocalization is positively correlated to the amount of fat initially present around the organ. Therefore, when possible, it is highly recommended to remove or trim as much visceral fat as possible from the organs (without damaging the tissue) before sectioning. By combining careful removal of visceral fat around the tissue and the employment of porous aluminum oxide slides, visceral fat delocalization can be greatly minimized, as shown by **Figure 5**. Lastly, special attention should be taken with respect to the choice of matrix and its deposition approach. To minimize vacuum exposure and therefore visceral fat delocalization during sample preparation, when possible, matrix spray deposition approaches should be considered.

2.5. Conclusions

In this work, we highlight a thorny issue in MALDI IMS of phospholipids: the on-tissue delocalization of visceral fat, inducing massive ion suppression effects and incoherent spatial distributions of many phospholipids species. To minimize these effects, we propose a new porous aluminum oxide sample slide (POR-30 min) used to mount thinly cut fresh frozen tissue sections that greatly minimizes visceral fat migration (including of TAGs) on and off tissue during sample preparation and analysis. Indeed, the porous oxide surface of the slides presents higher hydrophilicity and structural properties compared to standard ITO-coated slides, two properties that contribute to the reduction in fat migration. These porous aluminum oxide slides are easy to prepare, usable on both sides and reusable after section removal and sanding of the surface. Our results clearly show that porous type aluminum oxide slides perform better than the traditional

ITO-coated glass slides while allowing for a more accurate representation of IMS results and stronger correlation with histology.

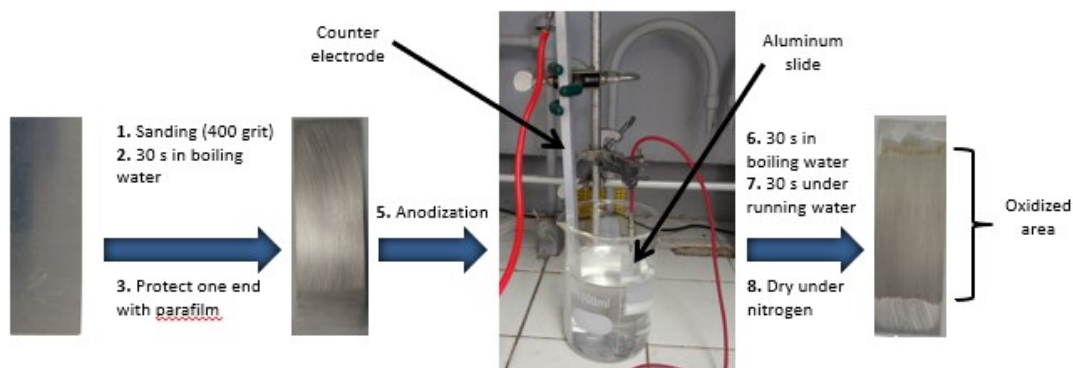
2.6. Acknowledgements

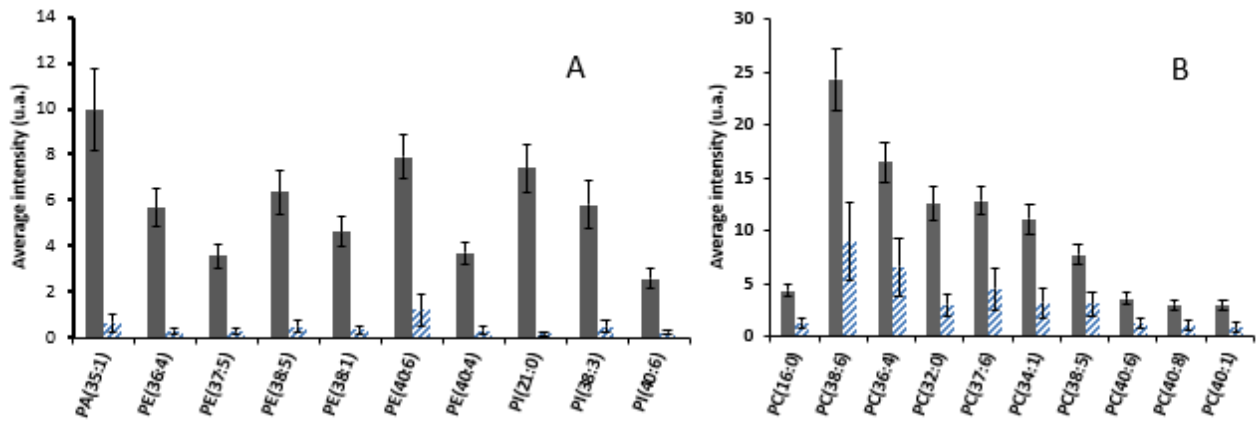
The authors would like to acknowledge funding from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). The authors would also like to acknowledge Pr. Jean-François Masson (Department of Chemistry, Université de Montréal) for unlimited access to the metal sputtering system, Pr. Antonella Badia (Department of Chemistry, Université de Montréal) for granting us access to the custom instrument for contact angle measurements, and Dr. Nidia Lauzon (Drug Discovery Platform at the Glen Site of the Research Institute of McGill University Health Center) for granting us access to the MALDI-TOF/TOF MS instrument.

2.7. Supplemental information

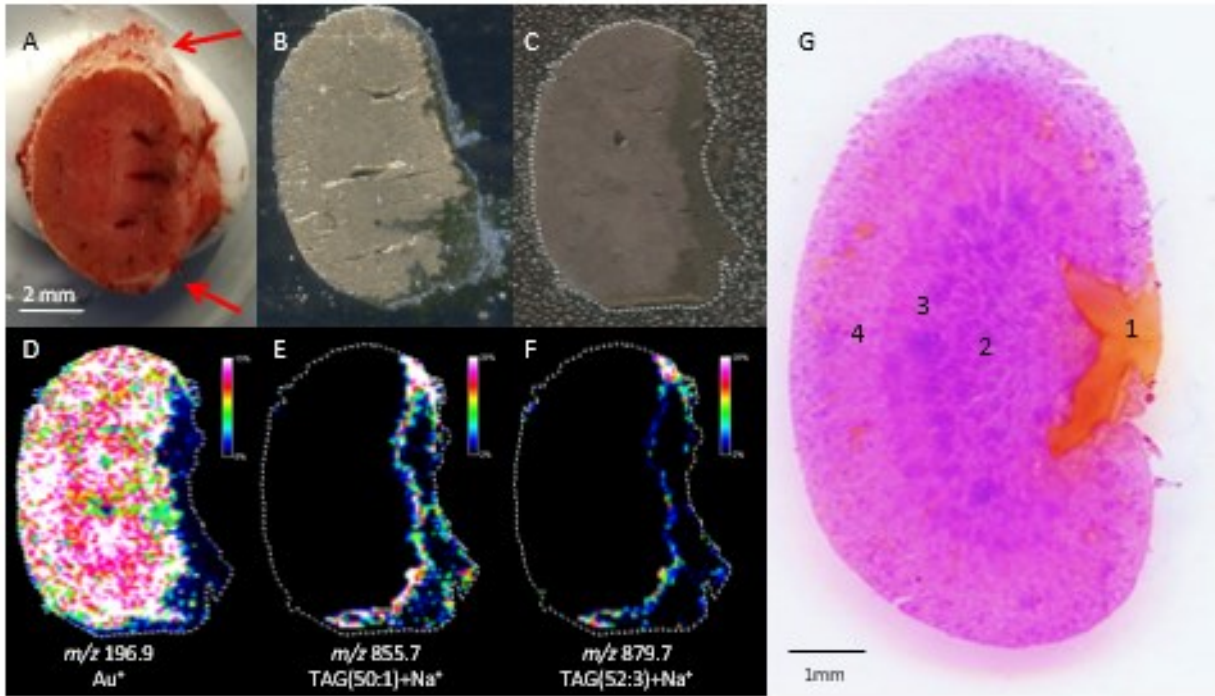
Supplemental figure 1: Aluminum oxide slide preparation protocol. Aluminum 6061-T6 was use for all analyses. Prior to slide preparation, make sure your aluminum slide is accurately cut 25x75 mm dimension and is perfectly flat. Flatness will be improved after sanding, but no major corrections can be made after.

1. Using 400 grit sand paper, carefully sand the aluminum slide on both sides to remove all scratches and grooves. Sand paper was fixed to a marble stone to insure a flat surface.
2. Remove the excess aluminum powder, dip the slide in boiling water for 30 s. Let the slide dry on a clean tissue (Kimwipes).
3. Wrap one end with parafilm to protect it from the anodization solution. Make sure the sealing is thick enough and tight. This is to ensure slide conductivity once placed in the MALDI target holder.
4. Attach an alligator clip (connected to the potentiostat) on the exposed end of the slide and immerse the slide into the sulfuric acid solution (15% v:v). Make sure the alligator clip never touches the solution or it will oxidize before the slide.
5. Turn on the potentiostat and apply 8 V of potential with reference to the aluminum bar used as counter electrode. Do not agitate the solution during the anodization process.
6. Wash the slide in boiling water for 30 s.
7. Remove the parafilm protection and wash the slide under running water for 30 s.
8. Dry the slide under a nitrogen stream.

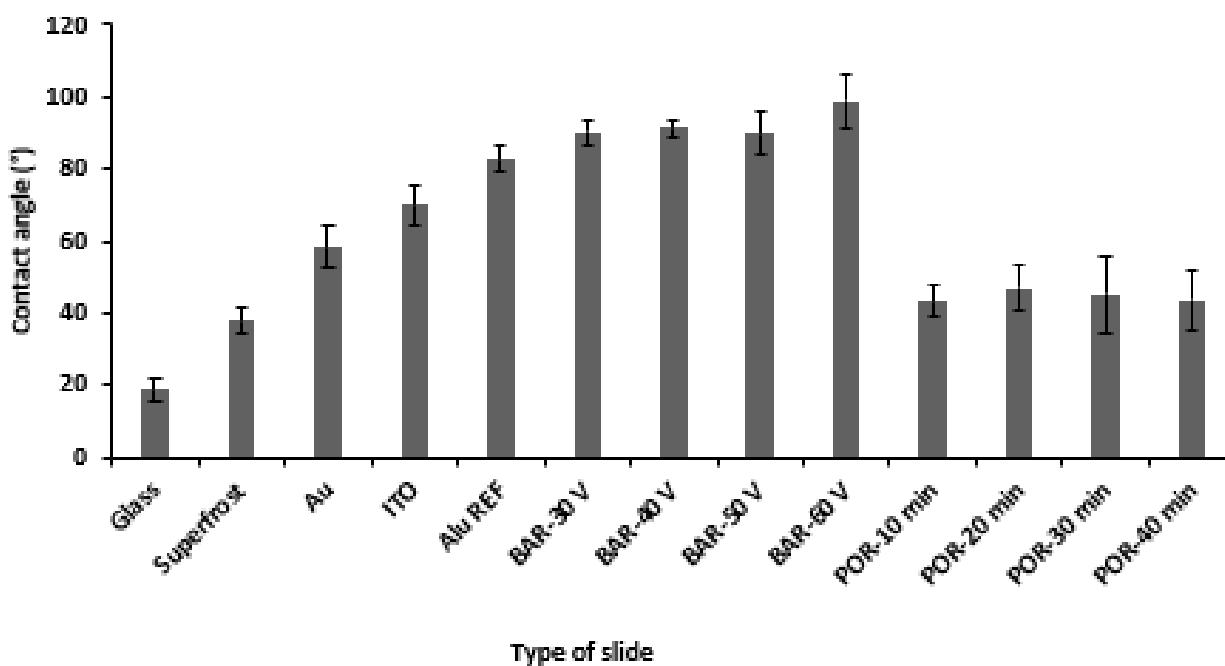




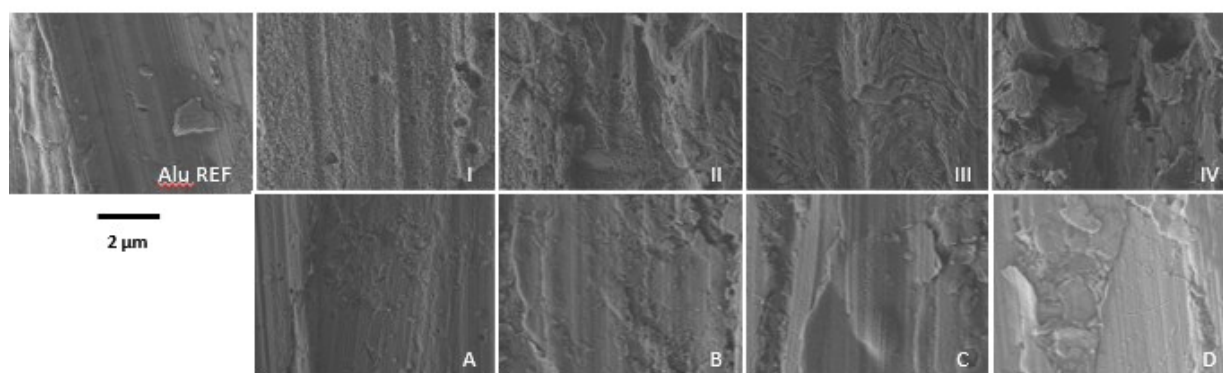
Supplemental figure 2: Ion suppression effects for various lipid species in the negative (A) and positive (B) ion mode. Grey bars represent the average intensity in reference region while blue bars represent the average intensity in the initial fat region. All negative mode lipids show a minimum of 10-fold decrease in intensity with PI(21:0) being the most affected with a 40-fold decrease. Lipids in positive mode were less affected by ion suppression with an average decrease of 4-fold. Pixels with intensities within top and bottom 10% were rejected and errors bars represent standard deviation of intensity (n>24).



Supplemental figure 3: Visual comparison of fat delocalization from thin tissue sections of mouse kidney with high visceral fat. (A) typical mouse kidney used throughout all experiments with a massive fat bundle located outside the hilum and two smaller bundles pointed by red arrows. Optical images of serial kidney sections after coating with (B) silver and (C) CBS-Au (for LDI IMS). (D), (E) and (F) display ion images for Au^+ and two TAGs acquired at $100\ \mu\text{m}$ of spatial resolution. In (B), after high resolution optical scanning, the bright yellow silver aggregates appear darker than the section and fat delocalization can be easily delimited. Comparisons of the optical image in (B) with the ion images in (E) and (F) confirmed that silver sputtering can be used to monitor visceral fat delocalization. Caption G shows a representative kidney section after H&E staining highlighting 4 mains histological regions with (1) pelvis, (2) inner medulla, (3) outer medulla and (4) cortex.

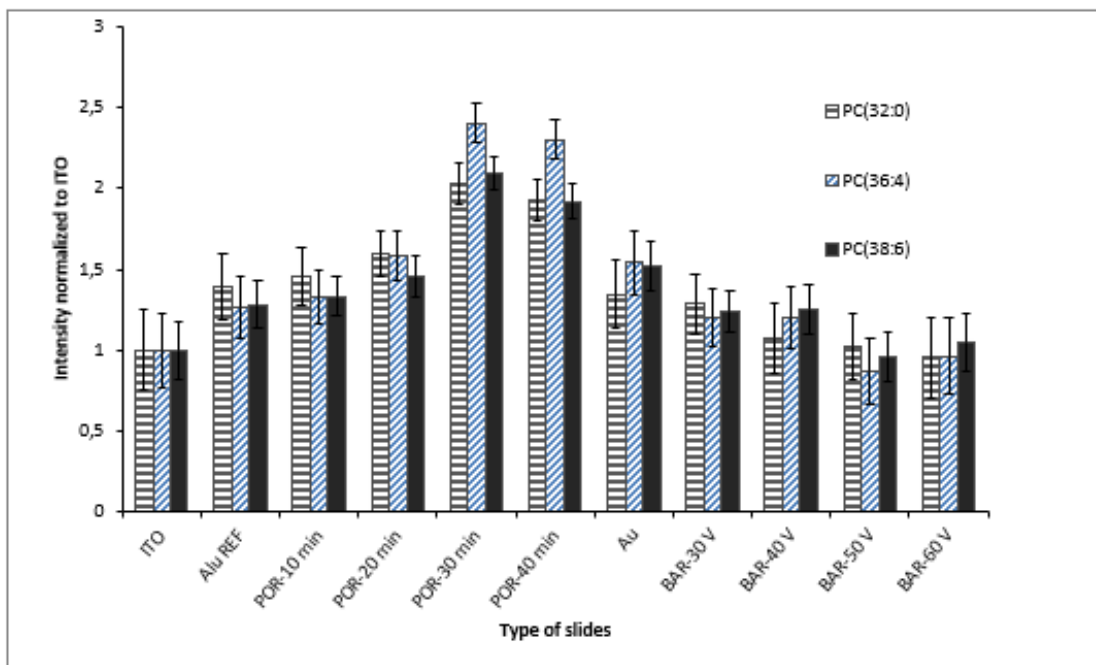


Supplemental figure 4: Contact angle measurements of water on tested slides. Errors bars represent standard deviation of 10 independent measurements.

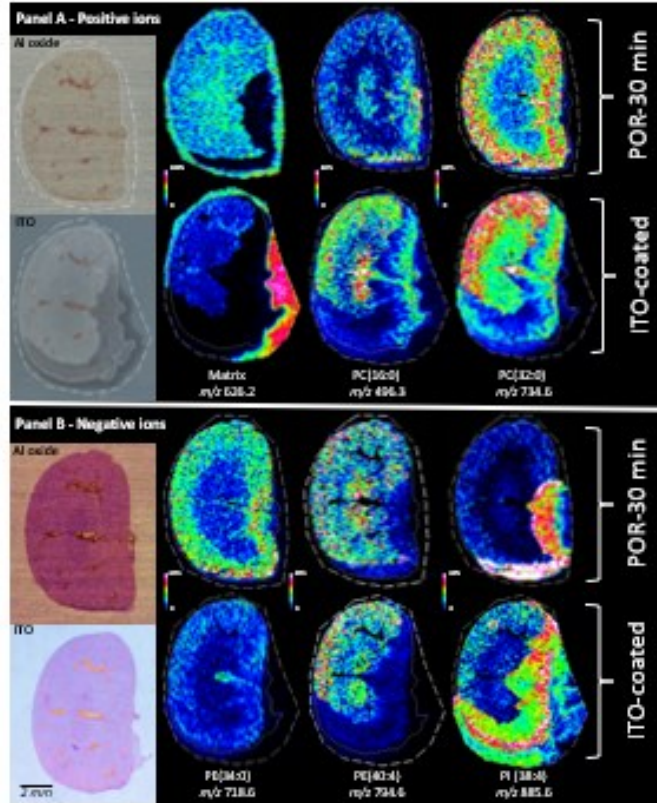


Supplemental figure 5: Representative SEM measurements of all the tested aluminum slides. Caption Alu REF is the starting material. Caption I to IV represent porous type aluminum oxide at various anodization times starting from 10 to 40 min with 10 min time increase. From I to IV, increase in surface roughness is observed. Caption A to D represent barrier type aluminum oxide slide oxidised under various potentials starting from 30 to 60 V with 10 V of potential increase. From A to D, no major change in topography was observed similar to that observed on the reference

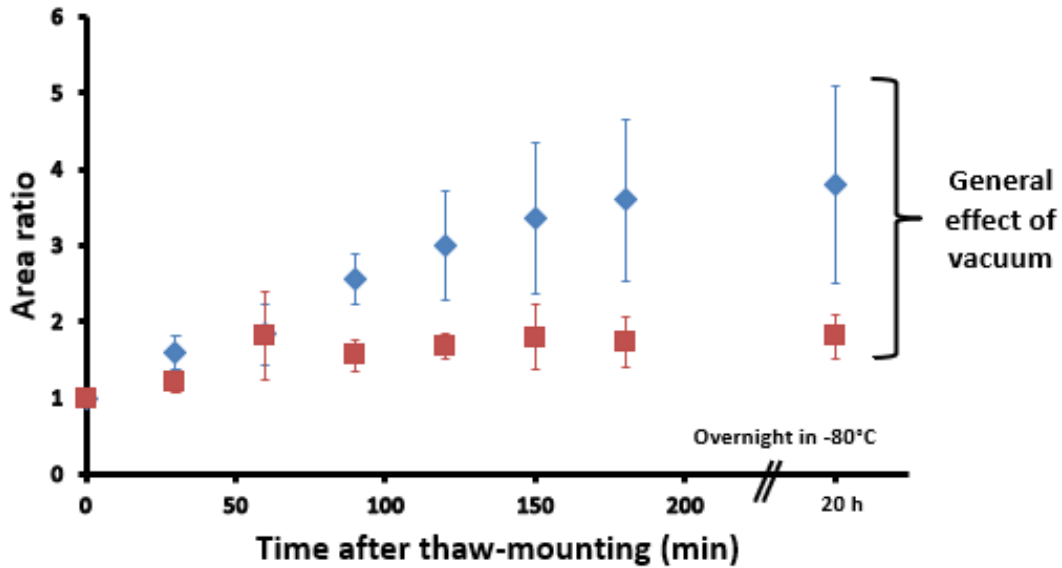
aluminum slide. All SEM images were acquire at 16 000 magnification with 2 kV of acceleration potential.



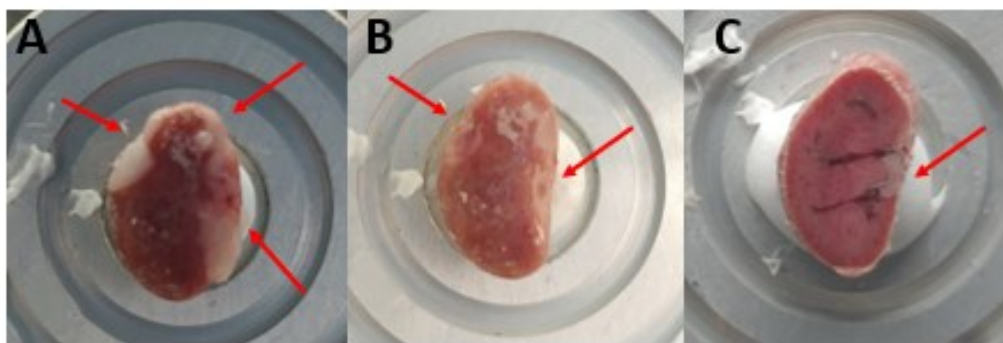
Supplemental figure 6: Effects of slide surface on phospholipid (PL) ion yield. 1,5-DAN matrix was deposited on sections from the fat free kidney homogenate bloc using a HTX TM Sprayer to insure reproducibility and to control the amount of matrix deposit. An area of approximately 400 pixels was selected on all sections and the IMS method was fully optimized to maximize PL intensity and mass resolution on ITO-coated slides prior to analysis. All instrument parameters including laser power and detector gain were kept constant after optimization. Pixels within the top and bottom 10% intensity were rejected to prevent interferences from hotspots and empty pixels. Errors bars represent standard deviation ($n \geq 315$ pixels per measurements) of Intensity normalized to ITO-coated slides. An increase of PL intensity is observed with increasing anodization time for the porous type aluminum oxide slides (from 10 to 40 min) with respect to the ITO-coated slides.



Supplemental figure 7: Phospholipid MALDI IMS of serial highly fatty mouse kidney sections mounted on optimized porous aluminum oxide (POR-30 min) and ITO-coated glass slides. Results were acquired with 100 μm of lateral resolution. Panels A and B show positive and negative ion mode results respectively. Panel A also presents photomicrographs of the sections after 1,5-DAN matrix sublimation where massive visual fat delocalization (FDZ) can be observed on the ITO-coated slide while no visual fat delocalization is observed on the POR-30 min slide. Panel B presents photomicrographs of the same sections after matrix removal and H&E staining. The matrix signal at m/z 626.2 (positive ion) clearly confirms extensive fat delocalization on the ITO-coated slide. However, even if no visual FDZ is visible on the POR-30 min slide, some ion suppression is still observed on the edge of the section bordered by the fat bundles (PE(40:4)) including for the matrix signal, clearly indicating the presence of a non-visible FDZ. However, on the aluminum oxide slide, numerous PL signals (PC(32:0), (PE(34:0)) displayed their expected distributions in kidney. Interestingly, other PL ions such as (PI(38:4)) were observed overexpressed in this non-visible FDZ.



Supplemental figure 8: On-section visual fat delocalization for high-fat homogenate sections thaw-mounted on ITO-coated slides as a function of time under 2 conditions : Red squares and Blue diamonds represent sections either left at ambient room conditions or submitted to a weak vacuum in a specimen desiccator, respectively. Area ratio were normalized to the initial area of fat immediately measured after thaw-mounting. Area was delimited visually with ImageJ software and errors bars represent standard deviation (n=3). A general trend of amplification of delocalization by vacuum can be observed directly after thaw-mounting.



Supplemental figure 9: Pictures of a highly fatty kidney used to produce the MALDI IMS data in Figure 5 before (A) and after (B) visceral fat removal, and after sectioning (C). Red arrows point to the fat bundles. Panel B confirms that most of the visceral fat has been removed while preserving the integrity of the kidney. Panel C shows some remaining fat around the hilum.

Step	Solution	Time
1	95% ethanol	30 seconds
2	70% ethanol	30 seconds
3	De-ionized water	30 seconds
4	Gill 3 Hematoxylin	15 seconds
5	De-ionized water	10 seconds
6	0.007% Sodium Bicarbonate in H ₂ O	5 dips
7	70% ethanol	30 seconds
8	95% ethanol	30 seconds
9	Eosin	5 dips
10	95% ethanol	30 seconds
11	100% ethanol	30 seconds
12	Air Dry	30 minutes
13	Mount slide with Cytoseal	NA

Supplemental table 1 : Protocol for H&E staining

Experimental <i>m/z</i>	Calculated <i>m/z</i>	Error PPM	Proposed Species	Adduct	Diagnostic Fragment(s)	Confirmation
496,38	496,34	73	PC(16:0)	[M+H] ⁺	184, 313	Berry et al.
524,38	524,37	8	PC(18:0)	[M+H] ⁺	184	Berry et al.
612,29			Matrix	Matrix cluster	158, 299	Molin et al.
626,37			Matrix	Matrix cluster	158, 299	Molin et al.
734,60	734,57	47	PC(32:0)	[M+H] ⁺	184	Berry et al.
758,56	758,57	-14	PC(34:2)	[M+H] ⁺	184	Berry et al.
760,58	760,59	-6	PC(34:1)	[M+H] ⁺	184	Berry et al.
782,54	782,57	-43	PC(36:4)	[M+H] ⁺	184	Berry et al.
784,55	784,59	-47	PC(36:3)	[M+H] ⁺	184	Berry et al.
786,56	786,60	-50	PC(36:2)	[M+H] ⁺	184	Berry et al.
792,56	792,55	2	PC(37:6)	[M+H] ⁺	184	NA
806,53	806,57	-49	PC(38:6)	[M+H] ⁺	184	Berry et al.
808,56	808,59	-30	PC(38:5)	[M+H] ⁺	184	Sue Ah Noh et al.
810,57	810,60	-34	PC(38:4)	[M+H] ⁺	184	Berry et al.
830,54	830,57	-35	PC(40:8)	[M+H] ⁺	184	Sue Ah Noh et al.
834,60	834,60	3	PC(40:6)	[M+H] ⁺	184	Berry et al.
844,63	844,68	-55	PC(40:1)	[M+H] ⁺	184	NA
853,7	853,7256	-30	TAG(50:2) + Na ⁺	[M+Na ⁺] ⁺	239, 265, 305, 549, 597	Dufresne et al.
855,7	855,7412	-48	TAG(50:1) + Na ⁺	[M+Na ⁺] ⁺	239, 265, 303, 305, 551, 600	Dufresne et al.
879,7	879,7412	-47	TAG(52:3) + Na ⁺	[M+Na ⁺] ⁺	239, 265, 575, 577	Dufresne et al.
905,7	905,7569	-63	TAG(54:4) + Na ⁺	[M+Na ⁺] ⁺	264, 304, 601	Dufresne et al.

Experimental <i>m/z</i>	Calculated <i>m/z</i>	Error PPM	Proposed Species	Adduct	Diagnostic Fragment(s)	Litterature
-687,58	-687,50	13	PA(16:0/19:1)	[M-H] ⁻	153, 255	NA
-718,57	-718,54	4	PE(16:0/18:0)	[M-H] ⁻	153, 255, 283, 452, 462, 480	NA
-738,54	-738,51	5	PE(16:0/20:4)	[M-H] ⁻	153, 255, 303, 452	NA
-750,57	-750,51	8	PE(37:5)	[M-H] ⁻	123, 140, 153	NA
-762,56	-762,51	7	PE(38:6)	[M-H] ⁻	123, 153	Berry et al.
-764,56	-764,52	5	PE(38:5)	[M-H] ⁻	140	Berry et al.
-766,56	-766,54	3	PE(38:4)	[M-H] ⁻	122, 140, 153	Berry et al.
-772,59	-772,59	1	PE(38:1)	[M-H] ⁻	140	NA
-776,54	-776,56	-3	PE(0-18:0/22:6)	[M-H] ⁻	140, 466, 448	NA
-780,58	-780,61	-4	PE(34:45)	[M-H] ⁻	140, 153	NA
-790,60	-790,54	8	PE(18:0/22:6)	[M-H] ⁻	140, 153, 283, 287, 480	Berry et al.
-794,68	-794,57	14	PE(40:4)	[M-H] ⁻	140	Berry et al.
-795,66	-795,50	20	PI(21:0)	[M-H] ⁻	223	NA
-885,53	-885,55	-2	PI(38:4)	[M-H] ⁻	223, 241	Berry et al.
-887,58	-887,57	1	PI(38:3)	[M-H] ⁻	223, 241, 297,	NA
-909,59	-909,55	4	PI(18:0/22:6)	[M-H] ⁻	223, 241, 581, 589	Berry et al.

Supplemental table 2 : Assignments of observed PL ions by MALDI MS/MS

Berry, K. A.; Hankin, J. A.; Barkley, R. M.; Spraggins, J. M.; Caprioli, R. M.; Murphy, R. C., MALDI imaging of lipid biochemistry in tissues by mass spectrometry. *Chem. Rev.* **2011**, *111* (10), 6491-512.

Molin, L.; Seraglia, R.; Dani, F.; Prof, G.; Traldi, P., The double nature of 1,5-diaminonaphthalene as matrix-assisted laser desorption/ionization matrix: Some experimental evidence of the protonation and reduction mechanisms. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM* **2011**, *25*, 3091-6.

Noh, S. A.; Kim, S. M.; Park, S. H.; Kim, D. J.; Lee, J. W.; Kim, Y. G.; Moon, J. Y.; Lim, S. J.; Lee, S. H.; Kim, K. P., Alterations in Lipid Profile of the Aging Kidney Identified by MALDI Imaging Mass Spectrometry. *J. Proteome Res.* **2019**, *18* (7), 2803-2812.

Dufresne, M.; Masson, J.-F.; Chaurand, P., Sodium-Doped Gold-Assisted Laser Desorption Ionization for Enhanced Imaging Mass Spectrometry of Triacylglycerols from Thin Tissue Sections. *Anal. Chem.* **2016**, *88* (11), 6018-6025.

Chapitre 3 – Conclusion

En conclusion, les travaux présentés dans ce mémoire permettent de mettre en lumière un problème récurrent lors de l'analyse de sections tissulaire grasseuse et y proposent une solution concrète. Il a été montré que le gras viscéral présent sur les sections tissulaires migre sur et hors section en entraînant plusieurs espèces de phospholipides dans leur migration. Les analyses IMS de ces sections montrent une délocalisation des triacylglycérols, un composant majoritaire du gras viscéral, ainsi que des différentes espèces de phospholipides entraînés dans leur migration. Les analyses IMS sur homogénat de gras dopé artificiellement par du gras viscéral montrent un fort effet de suppression ioniques sur plusieurs espèces de phospholipides dont PC(32 :0) (mode d'ionisation positif) et PE(16 :0/20 :4) (mode d'ionisation négatif) avec respectivement des intensité diminuées de 40 fois et 19 fois sur les zones de délocalisation. Ces analyses ont d'ailleurs montré que les zones de délocalisation observées visuellement par les changements de couleur de la matrice, ne correspondent pas entièrement à l'étendue de la délocalisation des TAG, mais s'étendent bien au-delà. Cela montrait bien l'étendue du problème qu'est la délocalisation du gras viscéral.

Ces travaux montrent le développement, la fabrication et l'utilisation d'une nouvelle lame en oxyde d'aluminium permettant de drastiquement réduire la délocalisation du gras viscéral lors d'analyse par IMS de sections tissulaires minces. Cette lame peut être préparée facilement et rapidement en laboratoire, est utilisable sur ses deux faces et est entièrement réutilisable. La diminution de la délocalisation du gras viscéral est associée à la combinaison d'une plus grande porosité et hydrophilicité de ces lames en comparaison au lames ITO traditionnellement employés en IMS. L'utilisation de cette nouvelle lame a permis l'obtention de résultats IMS de haute qualité sans effet majeur de délocalisation pour des sections tissulaire bordées de gras.

3.1. Perspectives

Dans un premier temps, ces travaux soulignent la grande importance de la préparation des échantillons afin d'obtenir des résultats de haute qualité en imagerie par MS. Il est fortement recommandé de retirer un maximum de gras viscéral initialement présent autour des sections lorsque celui-ci n'est pas l'objet de l'analyse. Cela permet de réduire à la source la contamination du gras viscéral. Dans un second temps, les travaux présentés dans ce mémoire illustrent l'importance de la surface sur laquelle les échantillons sont déposées afin de procéder aux analyses IMS ainsi que son effet sur la délocalisation des analytes. Les lames en aluminium oxydés représentent une solution viable afin de diminuer la délocalisation du gras viscéral.

Ces lames en aluminium oxydé représentent une pièce maîtresse importante pour contrer la délocalisation du gras viscéral et des analytes en tout genre. Cependant, ces lames en aluminium sont opaques et ne sont pas compatibles avec les techniques de microscopies optiques. La combinaison de l'IMS avec des techniques de microscopie optique^{96,97} peut limiter l'utilisation à grande échelle de ces lames. De plus, ces lames sont électriquement moins conductives que les lames ITO couramment utilisées. Ce faisant, il est préférable de limiter la fréquence de répétition du laser à 333 Hz afin de réduire les effets de charge sur la lame, ce qui pourrait entraîner un décalage des temps de vol. En soi, ce n'est pas un problème pour la majorité des analyses. En revanche, cela peut limiter l'utilisation de certaines matrices ayant une stabilité moindre sous le vide poussé de la source d'ionisation MALDI. De plus, les avancées disponibles au niveau des lasers dans les plus récents instruments commerciaux présentent des fréquences d'acquisition laser de plus de 10 kHz. Il est évident que l'utilisation des lames en aluminium oxydés limiterait la pleine utilisation de ces instruments.

Afin de palier à ces deux problèmes, un tout nouveau type de lame pourrait être développé à partir de monocouches autoassemblées (SAM) sur lame d'or. Tout d'abord, les lames d'or sont électriquement plus conductives que les lames d'aluminium oxydé, ce qui prévient l'accumulation de charges causant un possible décalage en temps de vol. La formation de SAM sur surface d'or est une chimie très bien développée et sera un point de départ évident afin de contrôler l'hydrophobicité des surfaces¹¹⁷. En effet, l'utilisation de la haute réactivité thiol-Au rend la

fonctionnalisation des surfaces d'or extrêmement facile d'approche et permet d'en modifier les propriétés physicochimiques en changeant simplement la composition de la chaîne alkyle lié au thiol¹¹⁷. Selon les résultats présentés dans ce mémoire, il est attendu que les SAM ultra hydrophiles permettraient une meilleure ségrégation du gras viscéral. Par ailleurs, l'utilisation de SAM hydrophobes pourrait provoquer une migration désirée des lipides vers la surface et agir comme surface de capture spécifiques afin d'effectuer des transferts de molécules des sections par empreintes⁵⁵. Cela permettrait d'accroître la spécificité et la sensibilité des analyses MALDI IMS subséquentes en éliminant certains signaux interférents. Cet exemple met en valeur l'éventail des possibilités de modifications des surfaces d'analyses MALDI et confirme que ces recherches sont nécessaires et d'intérêt général.

D'ailleurs, l'utilisation de SAM en SALDI, sans matrice supplémentaire, fut premièrement démontrée par Mouradian et al. en 1996¹¹⁸ et a permis l'analyse d'oligonucléotides et de protéines. Par ailleurs, Hsieh et al. ont montré que la terminaison de la monocouche avec une amine primaire permettait de drastiquement augmenter la sensibilité des analyses peptidiques en SALDI sous pression atmosphérique¹¹⁹. Ces analyses ouvrent la porte à une infinité de combinaison au niveau des terminaisons des SAM permettant d'augmenter sélectivement la sensibilité envers une ou plusieurs classes de biomolécules. Il serait pertinent d'essayer de transférer ces méthodes en SALDI sous vide poussé et combiner ces avancés avec des SAMs permettant de minimiser la délocalisation du gras viscéral.

Pour conclure l'analyse des effets de surface sur la délocalisation du gras viscéral, il serait aussi intéressant d'étudier l'effet de la topographie des lames sur la délocalisation. En effet, les travaux présentés dans ce mémoire ont permis de montrer que la rugosité était un des éléments ayant un impact sur l'amplitude de la délocalisation. Le développement de surface avec des patrons de rugosité précis permettrait de déterminer une série de paramètres optimaux en lien avec la topographie des lames. Ces nouvelles surfaces gravées pourraient être jumelées aux SAM préalablement optimisées afin d'en modifier la réactivité et l'hydrophobicité. Cela permettrait de combiner les avantages topographiques et physicochimiques.

Au-delà des applications directes de ces lames en oxydes d'aluminium, il est souhaité que ces travaux susciteront un intérêt auprès des chercheurs utilisant l'IMS. En effet, la délocalisation du gras viscéral et la suppression ionique des TAGs sont des sujets déjà observés et connus par certains chercheurs spécialisés en IMS. Cependant, cela reste un sujet très peu abordé dans la littérature scientifique et très peu de solutions ont été proposées. Il est primordial que la question entourant la délocalisation des analytes reste d'intérêt prioritaire pour tous et que la communauté continue d'adresser ce problème. Par ailleurs, en plus d'apporter une solution concrète, il est espéré que ces travaux participeront au développement de l'intérêt porté aux surfaces sur lesquelles sont déposés les échantillons.

Références bibliographiques

1. Thomson, J. J., XL. Cathode Rays. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science* **1897**, *44* (269), 293-316.
2. Thomson, J. J., Rays of positive electricity. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character* **1913**, *89* (607), 1-20.
3. Bleakney, W., A New Method of Positive Ray Analysis and Its Application to the Measurement of Ionization Potentials in Mercury Vapor. *Physical Review* **1929**, *34* (1), 157-160.
4. Beckey, H. D., Field desorption mass spectrometry: A technique for the study of thermally unstable substances of low volatility. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics* **1969**, *2* (6), 500-502.
5. Munson, M. S. B.; Field, F. H., Chemical Ionization Mass Spectrometry. I. General Introduction. *Journal of the American Chemical Society* **1966**, *88* (12), 2621-2630.
6. Horning, E. C.; Horning, M. G.; Carroll, D. I.; Dzidic, I.; Stillwell, R. N., New picogram detection system based on a mass spectrometer with an external ionization source at atmospheric pressure. *Anal. Chem.* **1973**, *45* (6), 936-943.
7. Macfarlane, R. D.; Torgerson, D. F., Californium-252 plasma desorption mass spectroscopy. *Science* **1976**, *191* (4230), 920-5.
8. Herzog, R. F. K.; Viehböck, F. P., Ion Source for Mass Spectrography. *Physical Review* **1949**, *76* (6), 855-856.
9. Fenner, N. C.; Daly, N. R., Laser Used for Mass Analysis. *Rev. Sci. Instrum.* **1966**, *37* (8), 1068-1070.
10. Vastola, F. J.; Mumma, R. O.; Pirone, A. J., Analysis of organic salts by laser ionization. *Org. Mass Spectrom.* **1970**, *3* (1), 101-104.
11. Karas, M.; Bachmann, D.; Hillenkamp, F., Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules. *Anal. Chem.* **1985**, *57* (14), 2935-2939.
12. Karas, M.; Bachmann, D.; Bahr, U.; Hillenkamp, F., Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1987**, *78*, 53-68.
13. Leopold, J.; Popkova, Y.; Engel, K. M.; Schiller, J., Recent Developments of Useful MALDI Matrices for the Mass Spectrometric Characterization of Lipids. *Biomolecules* **2018**, *8* (4), 25.
14. O'Rourke, M. B.; Djordjevic, S. P.; Padula, M. P., The quest for improved reproducibility in MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* **2018**, *37* (2), 217-228.
15. Szajli, E.; Feher, T.; Medzihradzky, K. F., Investigating the quantitative nature of MALDI-TOF MS. *Mol. Cell. Proteomics* **2008**, *7* (12), 2410-8.
16. Knochenmuss, R., Ion formation mechanisms in UV-MALDI. *Analyst* **2006**, *131* (9), 966-86.
17. Karas, M.; Krüger, R., Ion Formation in MALDI: The Cluster Ionization Mechanism. *Chem. Rev.* **2003**, *103* (2), 427-440.
18. Ehring, H.; Karas, M.; Hillenkamp, F., Role of photoionization and photochemistry in ionization processes of organic molecules and relevance for matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Org. Mass Spectrom.* **1992**, *27* (4), 472-480.
19. Demirev, P.; Westman, A.; Reimann, C. T.; Håkansson, P.; Barofsky, D.; Sundqvist, B. U. R.; Cheng, Y. D.; Seibt, W.; Siegbahn, K., Matrix-assisted laser desorption with ultra-short laser pulses. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1992**, *6* (3), 187-191.

20. Setz, P. D.; Knochenmuss, R., Exciton Mobility and Trapping in a MALDI Matrix. *The Journal of Physical Chemistry A* **2005**, *109* (18), 4030-4037.
21. Knochenmuss, R.; Stortelder, A.; Breuker, K.; Zenobi, R., Secondary ion–molecule reactions in matrix-assisted laser desorption/ionization. *J. Mass Spectrom.* **2000**, *35* (11), 1237-1245.
22. Breuker, K.; Knochenmuss, R.; Zhang, J.; Stortelder, A.; Zenobi, R., Thermodynamic control of final ion distributions in MALDI: in-plume proton transfer reactions. *Int. J. Mass spectrom.* **2003**, *226* (1), 211-222.
23. Knochenmuss, R.; Zenobi, R., MALDI Ionization: The Role of In-Plume Processes. *Chem. Rev.* **2003**, *103* (2), 441-452.
24. Harrison, A. G., The gas-phase basicities and proton affinities of amino acids and peptides. **1997**, *16* (4), 201-217.
25. Breuker, K.; Knochenmuss, R.; Zenobi, R., Proton transfer reactions of matrix-assisted laser desorption/ionization matrix monomers and dimers. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1999**, *10* (11), 1111-1123.
26. Klassen, J. S.; Anderson, S. G.; Blades, A. T.; Kebarle, P., Reaction Enthalpies for $M+L = M+ + L$, Where $M+ = Na+ \text{ and } K+$ and $L = \text{Acetamide, N-Methylacetamide, N,N-Dimethylacetamide, Glycine, and Glycylglycine}$, from Determinations of the Collision-Induced Dissociation Thresholds. *The Journal of Physical Chemistry* **1996**, *100* (33), 14218-14227.
27. Knochenmuss, R.; Dubois, F.; Dale, M. J.; Zenobi, R., The Matrix Suppression Effect and Ionization Mechanisms in Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization. **1996**, *10* (8), 871-877.
28. Gross, J. H., Instrumentation. In *Mass Spectrometry: A Textbook*, Springer International Publishing: Cham, 2017; pp 151-292.
29. Cotter, R. J., The New Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **1999**, *71* (13), 445A-451A.
30. Cotter, R. J., Time-Of-Flight Mass Spectrometry, Instrumentation and Applications in Biological Research. *Instrumentation Science & Technology* **1998**, *26* (4), 433-434.
31. Wiley, W. C.; McLaren, I. H., Time-of-Flight Mass Spectrometer with Improved Resolution. *Rev. Sci. Instrum.* **1955**, *26* (12), 1150-1157.
32. Vestal, M. L.; Juhasz, P.; Martin, S. A., Delayed extraction matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1995**, *9* (11), 1044-1050.
33. Alikhanov, S. G., A new impulse technique for ion measurements. *Soviet Phys. JETP* **1957**, 452-3.
34. Mamyrin, B. A.; Karataev, V. I.; Shmikk, D. V.; Zagulin, V. A., The mass-reflectron A new nonmagnetic time-of-flight high resolution mass-spectrometer. *Zhurnal Eksperimental'noj i Teoreticheskoy Fiziki* **1973**, *64* (1), 82-89.
35. Gross, J. H., Tandem Mass Spectrometry. In *Mass Spectrometry: A Textbook*, Springer International Publishing: Cham, 2017; pp 539-612.
36. Briggs, D., Analysis of polymer surfaces by SIMS, 3—preliminary results from molecular imaging and microanalysis experiments. *Surf. Interface Anal.* **1983**, *5* (3), 113-118.
37. Caprioli, R. M.; Farmer, T. B.; Gile, J., Molecular Imaging of Biological Samples: Localization of Peptides and Proteins Using MALDI-TOF MS. *Anal. Chem.* **1997**, *69* (23), 4751-4760.

38. Yang, E.; Dufresne, M.; Chaurand, P., Enhancing Ganglioside Species Detection for MALDI-TOF Imaging Mass Spectrometry in Negative Reflectron Mode. *Int. J. Mass spectrom.* **2017**, *437*.
39. Van Nuffel, S.; Elie, N.; Yang, E.; Nouet, J.; Touboul, D.; Chaurand, P.; Brunelle, A., Insights into the MALDI Process after Matrix Deposition by Sublimation Using 3D ToF-SIMS Imaging. *Anal. Chem.* **2018**, *90* (3), 1907-1914.
40. Sun, C. L.; Liu, W.; Ma, S. S.; Zhang, M. M.; Geng, Y. L.; Wang, X., Development of a high-coverage matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging method for visualizing the spatial dynamics of functional metabolites in *Salvia miltiorrhiza* Bge. *Journal of Chromatography A* **2020**, *1614*, 9.
41. Qin, L.; Zhang, Y. W.; Liu, Y. Q.; He, H. X.; Han, M. M.; Li, Y. Y.; Zeng, M. M.; Wang, X. D., Recent advances in matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry imaging (MALDI-MSI) for in situ analysis of endogenous molecules in plants. *Phytochemical Analysis* **2018**, *29* (4), 351-364.
42. Yang, F. Y.; Chen, J. H.; Ruan, Q. Q.; Saqib, H. S. A.; He, W. Y.; You, M. S., Mass spectrometry imaging: An emerging technology for the analysis of metabolites in insects. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **2020**, *103* (4), 11.
43. Yang, E.; Gamberi, C.; Chaurand, P., Mapping the fly Malpighian tubule lipidome by imaging mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **2019**, *54* (6), 557-566.
44. Niehoff, A.-C.; Kettling, H.; Pirkl, A.; Chiang, Y. N.; Dreisewerd, K.; Yew, J. Y., Analysis of *Drosophila* Lipids by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometric Imaging. *Anal. Chem.* **2014**, *86* (22), 11086-11092.
45. Lauzon, N.; Chaurand, P., Detection of exogenous substances in latent fingerprints by silver-assisted LDI imaging MS: perspectives in forensic sciences. *Analyst* **2018**, *143* (15), 3586-3594.
46. Lauzon, N.; Dufresne, M.; Chauhan, V.; Chaurand, P., Development of Laser Desorption Imaging Mass Spectrometry Methods to Investigate the Molecular Composition of Latent Fingerprints. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry* **2015**, *26* (6), 878-886.
47. Pleik, S.; Spengler, B.; Ram Bhandari, D.; Luhn, S.; Schäfer, T.; Urbach, D.; Kirsch, D., Ambient-air ozonolysis of triglycerides in aged fingerprint residues. *Analyst* **2018**, *143* (5), 1197-1209.
48. Hinners, P.; Thomas, M.; Lee, Y. J., Determining Fingerprint Age with Mass Spectrometry Imaging via Ozonolysis of Triacylglycerols. *Anal. Chem.* **2020**, *92* (4), 3125-3132.
49. Han, X., Lipidomics for studying metabolism. *Nat Rev Endocrinol* **2016**, *12* (11), 668-679.
50. Edidin, M., Lipids on the frontier: a century of cell-membrane bilayers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2003**, *4* (5), 414-418.
51. Tsui-Pierchala, B. A.; Encinas, M.; Milbrandt, J.; Johnson, E. M., Jr., Lipid rafts in neuronal signaling and function. *Trends Neurosci.* **2002**, *25* (8), 412-417.
52. Bongrand, P., *Physical basis of cell-cell adhesion*. Boca Raton, Fla. : CRC Press: Boca Raton, Fla., 1988.
53. Dulloo, A. G.; Gubler, M.; Montani, J. P.; Seydoux, J.; Solinas, G., Substrate cycling between de novo lipogenesis and lipid oxidation: a thermogenic mechanism against skeletal muscle lipotoxicity and glucolipotoxicity. *Int J Obes Relat Metab Disord* **2004**, *28 Suppl 4*, S29-37.

54. Strupat, K.; Karas, M.; Hillenkamp, F., 2,5-Dihydroxybenzoic acid: a new matrix for laser desorption—ionization mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1991**, *111*, 89-102.
55. Thomas, A.; Charbonneau, J. L.; Fournaise, E.; Chaurand, P., Sublimation of New Matrix Candidates for High Spatial Resolution Imaging Mass Spectrometry of Lipids: Enhanced Information in Both Positive and Negative Polarities after 1,5-Diaminonaphthalene Deposition. *Anal. Chem.* **2012**, *84* (4), 2048-2054.
56. Cerruti, C. D.; Benabdellah, F.; Lapr evote, O.; Touboul, D.; Brunelle, A., MALDI Imaging and Structural Analysis of Rat Brain Lipid Negative Ions with 9-Aminoacridine Matrix. *Anal. Chem.* **2012**, *84* (5), 2164-2171.
57. Perry, W. J.; Patterson, N. H.; Prentice, B. M.; Neumann, E. K.; Caprioli, R. M.; Spraggins, J. M., Uncovering Matrix Effects on Lipid Analyses in MALDI Imaging Mass Spectrometry Experiments. *J. Mass Spectrom.* **2019**, e4491.
58. Eibisch, M.; Fuchs, B.; Schiller, J.; S u , R.; Teuber, K., Analysis of Phospholipid Mixtures from Biological Tissues by Matrix-Assisted Laser Desorption and Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS): A Laboratory Experiment. *J. Chem. Educ.* **2011**, *88* (4), 503-507.
59. Hansen, R. L.; Due nas, M. E.; Lee, Y. J., Sputter-Coated Metal Screening for Small Molecule Analysis and High-Spatial Resolution Imaging in Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry* **2019**, *30* (2), 299-308.
60. Dufresne, M.; Masson, J.-F.; Chaurand, P., Sodium-Doped Gold-Assisted Laser Desorption Ionization for Enhanced Imaging Mass Spectrometry of Triacylglycerols from Thin Tissue Sections. *Anal. Chem.* **2016**, *88* (11), 6018-6025.
61. Dufresne, M.; Thomas, A.; Breault-Turcot, J.; Masson, J.-F.; Chaurand, P., Silver-Assisted Laser Desorption Ionization For High Spatial Resolution Imaging Mass Spectrometry of Olefins from Thin Tissue Sections. *Anal. Chem.* **2013**, *85*.
62. Thomas, A.; Patterson, N. H.; Dufresne, M.; Chaurand, P., (MA)LDI MS Imaging at High Specificity and Sensitivity. In *Advances in MALDI and Laser-Induced Soft Ionization Mass Spectrometry*, Cramer, R., Ed. Springer International Publishing: Cham, 2016; pp 129-147.
63. Dufresne, M.; Patterson, N. H.; Lauzon, N.; Chaurand, P., Chapter Three - Assessing the Potential of Metal-Assisted Imaging Mass Spectrometry in Cancer Research. In *Adv. Cancer Res.*, Drake, R. R.; McDonnell, L. A., Eds. Academic Press: 2017; Vol. 134, pp 67-84.
64. Lauzon, N.; Dufresne, M.; Beaudoin, A.; Chaurand, P., Forensic analysis of latent fingerprints by silver-assisted LDI imaging MS on nonconductive surfaces. *J. Mass Spectrom.* **2017**, *52* (6), 397-404.
65. Ozawa, T.; Osaka, I.; Ihozaki, T.; Hamada, S.; Kuroda, Y.; Murakami, T.; Miyazato, A.; Kawasaki, H.; Arakawa, R., Simultaneous detection of phosphatidylcholines and glycerolipids using matrix-enhanced surface-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry with sputter-deposited platinum film. **2015**, *50* (11), 1264-1269.
66. M uller, W. H.; Verdin, A.; De Pauw, E.; Malherbe, C.; Eppe, G., Surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging: A review. *Mass Spectrom. Rev.* **2020**, 1-48.
67. Tanaka, K.; Waki, H.; Ido, Y.; Akita, S.; Yoshida, Y.; Yoshida, T.; Matsuo, T., Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1988**, *2* (8), 151-153.

68. Wei, J.; Buriak, J. M.; Siuzdak, G., Desorption–ionization mass spectrometry on porous silicon. *Nature* **1999**, *399* (6733), 243-246.
69. Nizioł, J.; Rode, W.; Zieliński, Z.; Ruman, T., Matrix-free laser desorption–ionization with silver nanoparticle-enhanced steel targets. *Int. J. Mass spectrom.* **2013**, *335*, 22-32.
70. Morris, N. J.; Anderson, H.; Thibeault, B.; Vertes, A.; Powell, M. J.; Razunguzwa, T. T., Laser desorption ionization (LDI) silicon nanopost array chips fabricated using deep UV projection lithography and deep reactive ion etching. *RSC Advances* **2015**, *5* (88), 72051-72057.
71. Widmaier, E. P.; Raff, H.; Strang, K. T.; Vander, A. J., *Physiologie humaine : les mécanismes du fonctionnement de l'organisme*. 6e éd. française / ed.; Chenelière éducation ; Maloine: Paris, 2013.
72. Ibrahim, M. M., Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obes Rev* **2010**, *11* (1), 11-8.
73. Yang, J.; Caprioli, R. M., Matrix sublimation/recrystallization for imaging proteins by mass spectrometry at high spatial resolution. *Anal. Chem.* **2011**, *83* (14), 5728-5734.
74. Angel, P. M.; Spraggins, J. M.; Baldwin, H. S.; Caprioli, R., Enhanced Sensitivity for High Spatial Resolution Lipid Analysis by Negative Ion Mode Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Imaging Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2012**, *84* (3), 1557-1564.
75. Fernández-Vega, A.; Chicano-Gálvez, E.; Prentice, B. M.; Anderson, D.; Priego-Capote, F.; López-Bascón, M. A.; Calderón-Santiago, M.; Avendaño, M. S.; Guzmán-Ruiz, R.; Tena-Sempere, M.; Fernández, J. A.; Caprioli, R. M.; Malagón, M. M., Optimization of a MALDI-Imaging protocol for studying adipose tissue-associated disorders. *Talanta* **2020**, *219*, 121184.
76. Yen, C. L.; Stone, S. J.; Koliwad, S.; Harris, C.; Farese, R. V., Jr., Thematic review series: glycerolipids. DGAT enzymes and triacylglycerol biosynthesis. *J. Lipid Res.* **2008**, *49* (11), 2283-2301.
77. Matheis, K., Combining TLC Separation with MS Detection - A Revival of TLC. *Journal of Glycomics & Lipidomics* **2015**, *01* (5).
78. Otieno, A. C.; Mwangela, S. M., Capillary electrophoresis-based methods for the determination of lipids—A review. *Analytica Chimica Acta* **2008**, *624* (2), 163-174.
79. Laboureur, L.; Ollero, M.; Touboul, D., Lipidomics by Supercritical Fluid Chromatography. *International Journal of Molecular Sciences* **2015**, *16* (6), 13868-13884.
80. Jurowski, K.; Kochan, K.; Walczak, J.; Nska, M. g.; Piekoszewski, W.; Buszewski, B. a., Analytical Techniques in Lipidomics: State of the Art. **2017**.
81. Li, M.; Yang, L.; Bai, Y.; Liu, H., Analytical Methods in Lipidomics and Their Applications. *Anal. Chem.* **2014**, *86* (1), 161-175.
82. Hu, T.; Zhang, J.-L., Mass-spectrometry-based lipidomics. *J. Sep. Sci.* **2018**, *41* (1), 351-372.
83. Della Corte, A.; Chitarrini, G.; Di Gangi, I. M.; Masuero, D.; Soini, E.; Mattivi, F.; Vrhovsek, U., A rapid LC–MS/MS method for quantitative profiling of fatty acids, sterols, glycerolipids, glycerophospholipids and sphingolipids in grapes. *Talanta* **2015**, *140*, 52-61.
84. Yao, L.; Gerde, J. A.; Lee, S.-L.; Wang, T.; Harrata, K. A., Microalgae Lipid Characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2015**, *63* (6), 1773-1787.
85. Wang, X. Y.; Schmitt, M. V.; Xu, L. N.; Jiao, Y. P.; Guo, L. J.; Lienau, P.; Reichel, A.; Liu, X. H., Quantitative molecular tissue atlas of Bis(monoacylglycero)phosphate and phosphatidylglycerol membrane lipids in rodent organs generated by methylation assisted high resolution mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **2019**, *1084*, 60-70.

86. King, A.; Baginski, M.; Morikawa, Y.; Rainville, P. D.; Gethings, L. A.; Wilson, I. D.; Plumb, R. S., Application of a Novel Mass Spectral Data Acquisition Approach to Lipidomic Analysis of Liver Extracts from Sitaxentan-Treated Liver-Humanized PXB Mice. *J. Proteome Res.* **2019**, *18* (11), 4055-4064.
87. Norris, J. L.; Caprioli, R. M., Analysis of tissue specimens by matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry in biological and clinical research. *Chem Rev* **2013**, *113* (4), 2309-2342.
88. Chughtai, K.; Heeren, R. M., Mass spectrometric imaging for biomedical tissue analysis. *Chem Rev* **2010**, *110* (5), 3237-3277.
89. Murphy, R. C.; Hankin, J. A.; Barkley, R. M.; Zemski Berry, K. A., MALDI imaging of lipids after matrix sublimation/deposition. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **2011**, *1811* (11), 970-975.
90. Kurreck, A.; Vandergrift, L. A.; Fuss, T. L.; Habbel, P.; Agar, N. Y. R.; Cheng, L. L., Prostate cancer diagnosis and characterization with mass spectrometry imaging. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* **2018**, *21* (3), 297-305.
91. Jackson, S. N.; Wang, H.-Y. J.; Woods, A. S., Direct Profiling of Lipid Distribution in Brain Tissue Using MALDI-TOFMS. *Anal. Chem.* **2005**, *77* (14), 4523-4527.
92. Dong, X.; Cheng, J.; Li, J.; Wang, Y., Graphene as a Novel Matrix for the Analysis of Small Molecules by MALDI-TOF MS. *Anal. Chem.* **2010**, *82* (14), 6208-6214.
93. Nasser Abdelhamid, H.; Wu, H.-F., Furoic and mefenamic acids as new matrices for matrix assisted laser desorption/ionization-(MALDI)-mass spectrometry. *Talanta* **2013**, *115*, 442-450.
94. Dufresne, M.; Patterson, N. H.; Norris, J. L.; Caprioli, R. M., Combining Salt Doping and Matrix Sublimation for High Spatial Resolution MALDI Imaging Mass Spectrometry of Neutral Lipids. *Anal. Chem.* **2019**, *91* (20), 12928-12934.
95. Palermo, A.; Forsberg, E. M.; Warth, B.; Aisporna, A. E.; Billings, E.; Kuang, E.; Benton, H. P.; Berry, D.; Siuzdak, G., Fluorinated Gold Nanoparticles for Nanostructure Imaging Mass Spectrometry. *ACS Nano* **2018**, *12* (7), 6938-6948.
96. Chaurand, P.; Schwartz, S. A.; Billheimer, D.; Xu, B. J.; Crecelius, A.; Caprioli, R. M., Integrating Histology and Imaging Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2004**, *76* (4), 1145-1155.
97. Patterson, N. H.; Tuck, M.; Lewis, A.; Kaushansky, A.; Norris, J. L.; Van de Plas, R.; Caprioli, R. M., Next Generation Histology-Directed Imaging Mass Spectrometry Driven by Autofluorescence Microscopy. *Anal. Chem.* **2018**, *90* (21), 12404-12413.
98. Emerson, B.; Gidden, J.; Lay, J. O., Jr.; Durham, B., A rapid separation technique for overcoming suppression of triacylglycerols by phosphatidylcholine using MALDI-TOF MS. *J. Lipid Res.* **2010**, *51* (8), 2428-2434.
99. Zavalin, A.; Todd, E. M.; Rawhouser, P. D.; Yang, J.; Norris, J. L.; Caprioli, R. M., Direct imaging of single cells and tissue at sub-cellular spatial resolution using transmission geometry MALDI MS. *J. Mass Spectrom.* **2012**, *47* (11), 1473-1481.
100. Arakawa, R.; Kawasaki, H., Functionalized nanoparticles and nanostructured surfaces for surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal. Sci.* **2010**, *26* (12), 1229-1240.
101. Watanabe, T.; Kawasaki, H.; Yonezawa, T.; Arakawa, R., Surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (SALDI-MS) of low molecular weight organic

- compounds and synthetic polymers using zinc oxide (ZnO) nanoparticles. *J. Mass Spectrom.* **2008**, *43* (8), 1063-1071.
102. Sunner, J.; Dratz, E.; Chen, Y.-C., Graphite surface-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of peptides and proteins from liquid solutions. *Anal. Chem.* **1995**, *67* (23), 4335-4342.
103. Pan, C.; Xu, S.; Hu, L.; Su, X.; Ou, J.; Zou, H.; Guo, Z.; Zhang, Y.; Guo, B., Using oxidized carbon nanotubes as matrix for analysis of small molecules by MALDI-TOF MS. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2005**, *16* (6), 883-892.
104. Kancharla, V.; Bashir, S.; Liu, J. L.; Ramirez, O. M.; Derrick, P. J.; Beran, K. A., Effect of metal surfaces on matrix-assisted laser desorption/ionization analyte peak intensities. *Eur. J. Mass Spectrom.* **2017**, *23* (5), 287-299.
105. Groseclose, M. R.; Castellino, S., A mimetic tissue model for the quantification of drug distributions by MALDI imaging mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2013**, *85* (21), 10099-10106.
106. Chen, J.; Yao, M.; Xiao, R.; Yang, P.; Hu, B.; Yao, X., The application of the barrier-type anodic oxidation method to thickness testing of aluminum films. *Rev. Sci. Instrum.* **2014**, *85* (9), 094101.
107. Hass, G., On the Preparation of Hard Oxide Films with Precisely Controlled Thickness on Evaporated Aluminum Mirrors. *Journal of the Optical Society of America* **1949**, *39* (7), 532-540.
108. Flament, C.; Ribis, J.; Garnier, J.; Vandenberghe, T.; Henry, J.; Deschamps, A., Electron irradiation-enhanced core/shell organization of Al(Cr, Fe, Mn)Si dispersoids in Al–Mg–Si alloys. *Philosophical Magazine* **2015**, *95* (8), 906-917.
109. Schneider, C. A.; Rasband, W. S.; Eliceiri, K. W., NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* **2012**, *9* (7), 671-675.
110. Bemis, K. D.; Harry, A.; Eberlin, L. S.; Ferreira, C.; van de Ven, S. M.; Mallick, P.; Stolowitz, M.; Vitek, O., Cardinal: an R package for statistical analysis of mass spectrometry-based imaging experiments. *Bioinformatics* **2015**, *31* (14), 2418-2420.
111. Gibb, S.; Strimmer, K., MALDIquant: a versatile R package for the analysis of mass spectrometry data. *Bioinformatics* **2012**, *28* (17), 2270-2271.
112. Jain, P. K.; Lee, K. S.; El-Sayed, I. H.; El-Sayed, M. A., Calculated Absorption and Scattering Properties of Gold Nanoparticles of Different Size, Shape, and Composition: Applications in Biological Imaging and Biomedicine. *The Journal of Physical Chemistry B* **2006**, *110* (14), 7238-7248.
113. Evanoff Jr., D. D.; Chumanov, G., Synthesis and Optical Properties of Silver Nanoparticles and Arrays. *ChemPhysChem* **2005**, *6* (7), 1221-1231.
114. He, B.; Patankar, N. A.; Lee, J., Multiple Equilibrium Droplet Shapes and Design Criterion for Rough Hydrophobic Surfaces. *Langmuir* **2003**, *19* (12), 4999-5003.
115. Adamson, A. W., *Physical chemistry of surfaces*. 6th ed.. ed.; New York,Toronto : Wiley: New York,Toronto, 1997.
116. McLauchlin, M. L.; Yang, D.; Aella, P.; Garcia, A. A.; Picraux, S. T.; Hayes, M. A., Evaporative Properties and Pinning Strength of Laser-Ablated, Hydrophilic Sites on Lotus-Leaf-like, Nanostructured Surfaces. *Langmuir* **2007**, *23* (9), 4871-4877.
117. Love, J. C.; Estroff, L. A.; Kriebel, J. K.; Nuzzo, R. G.; Whitesides, G. M., Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology. *Chem. Rev.* **2005**, *105* (4), 1103-1170.

118. Mouradian, S.; Nelson, C. M.; Smith, L. M., A Self-Assembled Matrix Monolayer for UV-MALDI Mass Spectrometry. *Journal of the American Chemical Society* **1996**, *118* (36), 8639-8645.
119. Hsieh, S.; Ku, H.-Y.; Ke, Y.-T.; Wu, H.-F., Self-assembled-monolayer-modified silicon substrate to enhance the sensitivity of peptide detection for AP-MALDI mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **2007**, *42* (12), 1628-1636.